

RAPHAEL ORÉLIS RIBEIRO

**DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO:
DESVENDANDO QUESTÕES ETIOLÓGICAS,
EPIDEMIOLÓGICAS E DE SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia dos Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Walter A. Boeger

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente

CURITIBA

2008



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

“DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO: DESVENDANDO QUESTÕES ETIOLÓGICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E DE SAÚDE PÚBLICA”

por

RAPHAEL ORELIS RIBEIRO

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**


Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger (Orientador e Presidente)


Prof. Dr. Márcio Roberto Pie (Membro Titular)


Prof. Dr. Eduardo Bagagli (Membro Titular-Externo)


Profª. Drª Vânia Aparecida Vicente (Membro Suplente)

Curitiba, 3 de março de 2008

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

...ao prof. Dr. Walter A. Boeger pela orientação, credibilidade, suporte, e principalmente, oportunidade concedida de trabalhar neste insigne projeto;

...a prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente por seu apoio entusiástico, além das essenciais doutrinações no âmbito da microbiologia;

...ao prof. Dr. Marcio R. Pie pelas notáveis colaborações na elaboração dos experimentos *in vitro*;

...ao prof. Dr. Rogério Tubino Vianna e a prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol pelas minuciosas correções da pré-tese e valiosas sugestões na banca de qualificação;

...aos membros do Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais (GIA) e do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE) que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste projeto;

...aos meus pais, irmãos e demais familiares pelo apoio incondicional;

...ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

“Hipóteses são redes: só quem as lança irá capturar alguma coisa”.

Novalis

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO GERAL.....	xiv
GENERAL ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1 OBJETIVOS.....	08
1.1.1 Objetivo específico.....	08
REFERÊNCIAS.....	10
2 DCL: TESTE DE PATOGENICIDADE <i>IN VIVO</i> EM <i>Ucides cordatus</i>.....	14
RESUMO.....	14
2.1 INTRODUÇÃO.....	14
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.2.1 Coleta de material biológico, isolamento e identificação do agente.....	19
2.2.2 Teste de patogenicidade.....	22
2.2.2.1 Bioensaio de infecção contínua e não - contínua <i>in vivo</i>	22
2.2.2.2 Histologia.....	26
2.2.2.3 Identificação molecular.....	27
2.2.2.4 Análises microbiológicas.....	28
2.3 RESULTADOS.....	29
2.3.1 Taxa de mortalidade nas infecções experimentais.....	29
2.3.2 Histopatologia.....	31
2.3.3 Identificação molecular.....	36
2.3.4 Análises microbiológicas.....	37
2.4 DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO.....	49
3 DCL: TESTE DE ETIOLOGIA VIRAL.....	51
RESUMO.....	51
3.1 INTRODUÇÃO.....	51

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.2.1 Desenho experimental.....	53
3.3 RESULTADOS.....	54
3.4 DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
4 DCL: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA TOLERÂNCIA DO AGENTE ETIOLÓGICO A DIFERENTES SALINIDADES.....	59
RESUMO.....	59
4.1 INTRODUÇÃO.....	59
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.2.1 Linhagem.....	60
4.2.2 Tratamentos.....	61
4.2.3 Tempo de exposição.....	61
4.2.4 Avaliação do crescimento das colônias.....	61
4.3 RESULTADOS.....	62
4.4 DISCUSSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	70
5 DCL: EFEITOS DA COCÇÃO SOBRE O AGENTE ETIOLÓGICO.....	74
RESUMO.....	74
5.1 INTRODUÇÃO.....	74
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
5.2.1 Coleta do material biológico.....	76
5.2.2 Avaliação da temperatura interna dos <i>Ucides cordatus</i> submetidos à cocção.....	76
5.2.3 Ensaios de resistência de <i>Exophiala</i> sp. a temperatura de cocção.....	77
5.3 RESULTADOS.....	77
5.3.1 Temperatura interna de <i>Ucides cordatus</i>	77
5.3.2 Resistência de <i>Exophiala</i> sp. a temperatura de cocção.....	78
5.4 DISCUSSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	REPRESENTANTE ADULTO DA ESPÉCIE DE CARANGUEJO <i>Ucides cordatus</i>	01
FIGURA 2-	MAPA DO CONTINENTE AMERICANO COM A DISTRIBUIÇÃO DO CARANGUEJO <i>Ucides cordatus</i>	02
FIGURA 3-	ESTADOS BRASILEIROS QUE APRESENTARAM REGISTROS DE EXPRESSIVAS MORTANDADES DE CARANGUEJO <i>Ucides cordatus</i> DURANTE EVENTOS DE DCL.....	04
FIGURA 4-	CONIDIOGÊNESE DO FUNGO DEMATIÁCEO ASSOCIADO A DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO.....	06
FIGURA 5-	ESQUEMÁTICA VISTA GERAL DOS TÓPICOS ABORDADOS POR ESTA DISSERTAÇÃO.....	09
FIGURA 6-	ESTRUTURA DO GENE QUE CODIFICA O DNAr E POSIÇÕES DOS PRINCIPAIS INICIADORES FÚNGICOS UTILIZADOS.....	17
FIGURA 7-	ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS POSTULADOS DE KOCH NO CONTEXTO DA DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO.....	19
FIGURA 8-	LOCAIS, COORDENADAS, DATAS DE COLETA, NÚMERO DE CARANGUEJOS AMOSTRADOS E SALINIDADE LOCAL.....	20
FIGURA 9-	DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE <i>Ucides cordatus</i> NOS ESTADOS DE SERGIPE E BAHIA.....	20

FIGURA 10- TEMPO MÉDIO DE RECUPERAÇÃO DE <i>Ucides cordatus</i> VIRADOS COM O DORSO DA CARAPAÇA PARA BAIXO E OS RESPECTIVOS ÍNDICES DE HIGIEZ ASSOCIADOS AO NÚMERO DE ANIMAIS DETECTADOS DENTRO DE CADA CATEGORIA.....	21
FIGURA 11- RECIPIENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE INFECÇÃO CONTÍNUA E NÃO-CONTÍNUA PARA ALOJAMENTO DOS CARANGUEJOS.....	23
FIGURA 12- LOCALIZAÇÃO DO PONTO DE COLETA DE CARANGUEJOS-UÇÁ SADIOS.....	23
FIGURA 13- ESQUEMA GERAL DAS METODOLOGIAS APLICADAS NOS BIOENSAIOS.....	24
FIGURA 14- ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS COLÔNIAS DO FUNGO <i>Exophiala</i> sp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	25
FIGURA 15- CORTE LONGITUDINAL DO CEFALOTÓRAX DE <i>U. cordatus</i> , COM DESTAQUE PARA OS TECIDOS COLETADOS.....	26
FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA MORTALIDADE DE CARANGUEJOS-UÇÁ AO LONGO DO BIOENSAIO DE INFECÇÃO NÃO-CONTÍNUA.....	30
FIGURA 17- CURVAS DE MORTALIDADE DOS <i>U. cordatus</i> SUBMETIDOS AO BIOENSAIO DE INFECÇÃO-CONTÍNUA.....	31
FIGURA 18- HISTOLOGIA DE ESPÉCIMES SADIOS DE <i>Ucides cordatus</i>	34
FIGURA 19- HISTOPATOLOGIA DE ESPÉCIMES DE <i>Ucides cordatus</i> INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>Exophiala</i> sp.....	35

FIGURA 20- GEL DE AGAROSE COM O RESULTADO DA APLICAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR EM EXTRATOS DE CORAÇÃO DE <i>Ucides cordatus</i> ARTIFICIALMENTE INFECTADOS COM <i>Exophiala</i> sp.....	37
FIGURA 21- COLÔNIAS LEVEDURIFORMES RE-ISOLADAS DE GÂNGLIO TORÁCICO, CORAÇÃO E HEPATOPÂNCREAS DE <i>Ucides cordatus</i> ARTIFICIALMENTE INFECTADOS COM <i>Exophiala</i> sp. E GEL DE AGAROSE EXIBINDO O RESULTADO DA APLICAÇÃO DOS MARCADORES ESPECÍFICOS NOS EXTRATOS DE DNA DESTAS COLÔNIAS.....	38
FIGURA 22- PRINCIPAIS AGENTES VIRAIS QUE AFETAM CULTIVOS DE CAMARÕES NAS AMÉRICAS.....	52
FIGURA 23- MACERAÇÃO DO HEPATOPÂNCREAS DE <i>U. cordatus</i> COM PISTILO, E POSTERIOR FILTRAGEM COM AUXÍLIO DE BOMBA DE VÁCUO EM FILTROS 2,5 µM E 0,2 µM.....	53
FIGURA 24- TAXAS DE MORTALIDADE NOS TRATAMENTOS REFERENTES AO TESTE DE ETIOLOGIA VIRAL.....	54
FIGURA 25- LAMELAS BRANQUIAIS DO CARANGUEJO <i>Scylla serrata</i> INFECTADO EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS WSSV E LAMELAS BRANQUIAIS DE ESPÉCIMES DE <i>Ucides cordatus</i> SUBMETIDOS AO TESTE DE ETIOLOGIA VIRAL DO PRESENTE ESTUDO.....	55
FIGURA 26- REPRESENTAÇÃO DA MÉDIA DAS ÁREAS PREENCHIDAS EM PLACAS DE PETRI POR UFCs DE <i>Exophiala</i> sp. PREVIAMENTE EXPOSTAS A DIFERENTES GRAUS DE SALINIDADE PELO PERÍODO DE: 1 HORA; 1 DIA E 1 SEMANA.....	64

FIGURA 27- PADRÃO DE CRESCIMENTO DAS UFCs PREVIAMENTE EXPOSTAS POR 1 HORA, 24 HORAS e 1 SEMANA AS DIFERENTES SALINIDADES.....	65
FIGURA 28- ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA INTERNA DE ESPÉCIMES DE <i>U. cordatus</i> SUBMETIDOS À COCÇÃO.....	78
FIGURA 29- CRESCIMENTO LEVEDURIFORME DE <i>Exophiala</i> sp. APÓS CRESCENTES INTERVALOS DE EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA DE COCÇÃO.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE DOIS FATORES (INTERVALOS DE EXPOSIÇÃO X SALINIDADES).....	62
TABELA 2-	AGRUPAMENTO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS NOS DIFERENTES INTERVALOS DE EXPOSIÇÃO E SALINIDADES DE ACORDO COM A D.M.S DO TESTE DE FISHER.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® -	Marca registrada
µL -	Microlitro
µM -	Micrômetro
18S -	Subunidade ribossomal menor
28S -	Subunidade ribossomal maior
AFA -	Álcool, Formol e Ácido acético
ANOVA -	Análise de variância
BHI -	<i>Brain Heart Infusion</i>
D.M.S. -	Diferença Mínima Significativa
DCL -	Doença do Caranguejo Letárgico
DHN -	Dihidroxinaftaleno
DMSO -	Dimetil sulfóxido
DNAr -	Ácido desoxiribonucléico ribossomal
DNTP -	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g-	Força centrífuga relativa
GIA -	Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais
HE -	Hematoxilina de Harris e Eosina
IGS -	<i>Intergenic Spacer</i>
ITS -	<i>Internal transcribed Spacer</i>
kpb -	Kilo pares de bases
mg-	Miligramas
MgCl –	Cloreto de magnésio
NaClO -	Hipoclorito de sódio
NaOH -	Hidróxido de sódio
ng -	Nanogramas
NJ -	<i>Neighbor Joining</i>
PAS -	<i>Periodic Acid Schiff</i>
pb -	Pares de bases
PCR -	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pixel -	<i>Picture element</i>

ppm -	Partes por milhão
ProFO -	Profenoloxidase
SDS -	Dodecil Sulfato de Sódio
Tris -	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UFC -	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO GERAL

Expressivas mortandades de *Ucides cordatus*, popularmente conhecido como caranguejo-uçá, têm sido registradas por catadores de caranguejos e biólogos ao longo da costa brasileira, principalmente na região nordeste. Por motivo dos sintomas característicos, a epizootia foi denominada Doença do Caranguejo Letárgico. Após diversas suspeitas, estudos preliminares identificaram uma levedura negra (*Exophiala* sp.) nas amostras teciduais de espécimes de *U. cordatus* moribundos, responsabilizando-a pelos eventos de mortandade. Assim, o objetivo desta dissertação foi buscar evidências, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*, que suportem essa correlação. Investigou-se não apenas a patogenicidade de *Exophiala* sp., mas também sua possível dispersão marinha e inativação durante procedimento de cocção de animais enfermos. Testes de patogenicidade foram realizados com espécimes de *U. cordatus* sadios coletados no litoral paranaense (local não atingido pelas mortandades). Com exceção da morte de 1 animal inoculado com solução salina, os demais controles não apresentaram mortandade nos 30 dias dos experimentos. Entretanto, ao final deste período, os caranguejos pertencentes aos ensaios de infecção não-contínua e contínua inoculados com elementos miceliais e hifas de *Exophiala* sp. apresentaram, respectivamente, 60% e 50% (n=6 e n=5) de mortes, o que indica a notável patogenicidade deste agente. Os animais moribundos apresentaram comportamento semelhante àquele observado no ambiente em animais enfermos com DCL, incluindo letargia, tetania e ataxia. Análises histopatológicas dos principais tecidos afetados foram compatíveis a esses sinais clínicos. Posteriormente, a aplicação de marcadores moleculares confirmou a identidade de *Exophiala* sp. re-isolada dos animais infectados, satisfazendo assim os Postulados de Koch. Outros bioensaios avaliaram a presença de partículas virais no tecido de caranguejos-uçá moribundos em decorrência da DCL. Depois de macerados e filtrados, a solução resultante dessas amostras de tecido foi inoculada em caranguejos sadios. Após o término do experimento foram registradas mortes apenas nos grupos controle (n=4), corroborando assim, a etiologia fúngica dessa epizootia. Posteriormente, análises *in vitro* avaliaram os padrões de crescimento de UFCs de *Exophiala* sp. previamente expostas a várias salinidades em diferentes intervalos. A análise de variância de dois fatores (Intervalos de exposição x Salinidades) e o teste de Fisher, apontaram um significativo efeito negativo das salinidades no crescimento das colônias ($p=0,044$). Entretanto, a surpreendente reprodução dessa levedura negra durante o mais longo intervalo de exposição (1 semana) ($p<0,001$), corrobora a hipótese de dispersão marinha baseada na distribuição dos eventos de mortandade de *U. cordatus*. Por fim, curtos intervalos de exposição (30 segundos) à elevada temperatura de cocção, mostraram-se eficientes na inativação de *Exophiala* sp. Confirmou-se, portanto, uma probabilidade quase nula de infecções cruzadas em humanos após ingestão de caranguejos-uçá moribundos previamente cozidos.

Palavras Chave: *Ucides cordatus*. Doença do Caranguejo Letárgico. *Exophiala* sp. Teste de patogenicidade. Dispersão marinha. Cocção.

GENERAL ABSTRACT

Massive mortalities of the mangrove land crab *Ucides cordatus*, regionally known as “caranguejo-uçá”, have been reported by crab-collectors and biologists along the Brazilian coast, mainly in Northeast region. Because of the symptoms depicted by the crabs, the epizootic was called Lethargic Crab Disease (LCD). After several suspected, preliminary analysis isolated a black yeast (*Exophiala* sp.) from tissue samples of specimens of moribund *U. cordatus*, blaming it by the mortality events. Thus, the aim of this dissertation was seek evidences, through *in vivo* and *in vitro* experiments, that support this correlation. Investigated not only the pathogenicity of *Exophiala* sp. but also its possible marine dispersion and inactivation during procedures of LCD animals cooking. The replicates of the tests of pathogenicity were performed with healthy specimens of *U. cordatus* collected on the coast Paraná state (local not reached by mortalities). Except for the death of 1 animal inoculated with saline, the other controls showed no mortalities within 30 days of experiments. However, the end of this period, the crabs belonging to these tests of infection non-continuous and continuous inoculated with micelial elements and hyphae of *Exophiala* sp. had, respectively, 60% and 50% (n=6 and n=5) of deaths, which indicates a remarkable pathogenicity of this agent. Crabs dying showed behavior similar to that observed in the environment in animals with LCD, including lethargy, ataxy and tetany. Analyses of the major histopathological tissue affected were consistent with these clinical signs. Subsequently, the application of molecular markers confirmed the identity of *Exophiala* sp. re-isolated of infected animals, thereby fulfilling the Koch's Postulates. Other tests evaluated the presence of viral particles in tissues of moribund *U. cordatus* due to the LCD. After macerated and filtered, the resulting solution of the samples of tissue were inoculated into healthy crabs. After the end of the experiment deaths were registered only in the control groups (n=4), thus corroborating, the fungal etiology of this disease. Later, *in vitro* analysis evaluated the patterns of CFUs growth of *Exophiala* sp. previously exposed to a wide range of salinities at different intervals. ANOVA “Two-ways” (Intervals of exposure x Salinities) and the test of Fisher showed a significant negative effect of salinity on the growth of colonies ($p=0,044$). However, the surprising reproduction of that black yeast during the longer interval exposure (1 week) ($p<0,001$), corroborate the hypothesis of marine dispersion based on the distribution of the events of mortalities of *U. cordatus*. Finally, short intervals of exposure (30 seconds) to the high temperature of cooking, became effective in the inactivation of *Exophiala* sp. Thus, it was confirmed an almost zero possibility of cross infection in humans after ingestion of moribund crabs pre-cooked.

Key Words: *Ucides cordatus*. Lethargic Crab Disease. *Exophiala* sp. Tests of pathogenicity. Marine dispersion. Cooking.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Sob o ponto de vista taxonômico, a espécie *Ucides cordatus* (FIGURA 1) é classificada nas seguintes categorias (MELO, 1998):

FILO: Arthropoda

SUB-FILO: Crustacea (Brünnich, 1772)

CLASSE: Malacostraca (Latreille, 1802)

SUB-CLASSE: Eumalacostraca (Grobber, 1892)

SUPER-ORDEM: Eucarida (Calman, 1904)

ORDEM: Decapoda (Latreille, 1802)

SUB-ORDEM: Pleocyemata (Burkenroad, 1963)

INFRA-ORDEM: Brachyura (Latreille, 1802)

SUPERFAMÍLIA: Ocypodoidea (Rafinesque, 1815)

FAMÍLIA: Ocypodidae (Rafinesque, 1815)

GÊNERO: *Ucides* (Rathbun, 1897)

ESPÉCIE: *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)



FIGURA 1- REPRESENTANTE ADULTO DA ESPÉCIE DE CARANGUEJO *Ucides cordatus*
FONTE: GIA/UFPR (2008)

O caranguejo *U. cordatus*, popularmente conhecido como “caranguejo-uçá”, “catanhão”, “caranguejo do mangue” ou “caranguejo-verdadeiro”, apresenta uma ampla distribuição pela costa Atlântica tropical e subtropical do continente americano, abrangendo o sul da Flórida (EUA), Golfo do México, América central, Antilhas, norte da América do Sul, Guianas, e Brasil (do estado do Amapá – 2° N, na foz do rio Oiapoque, até o extremo sul de Santa Catarina - estuário do rio Araranguá, 29° S) (COELHO e RAMOS, 1972; MELO, 1996; SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990) (FIGURA 2). Trata-se de uma das espécies mais conspícuas nos ecossistemas de manguezais dessas regiões, contribuindo com cerca de 84% da biomassa da epifauna (KOCH, 1999), e desta forma, apresentando importância ecológica e alta relevância sócio-econômica (GLASER e DIELE, 2004).

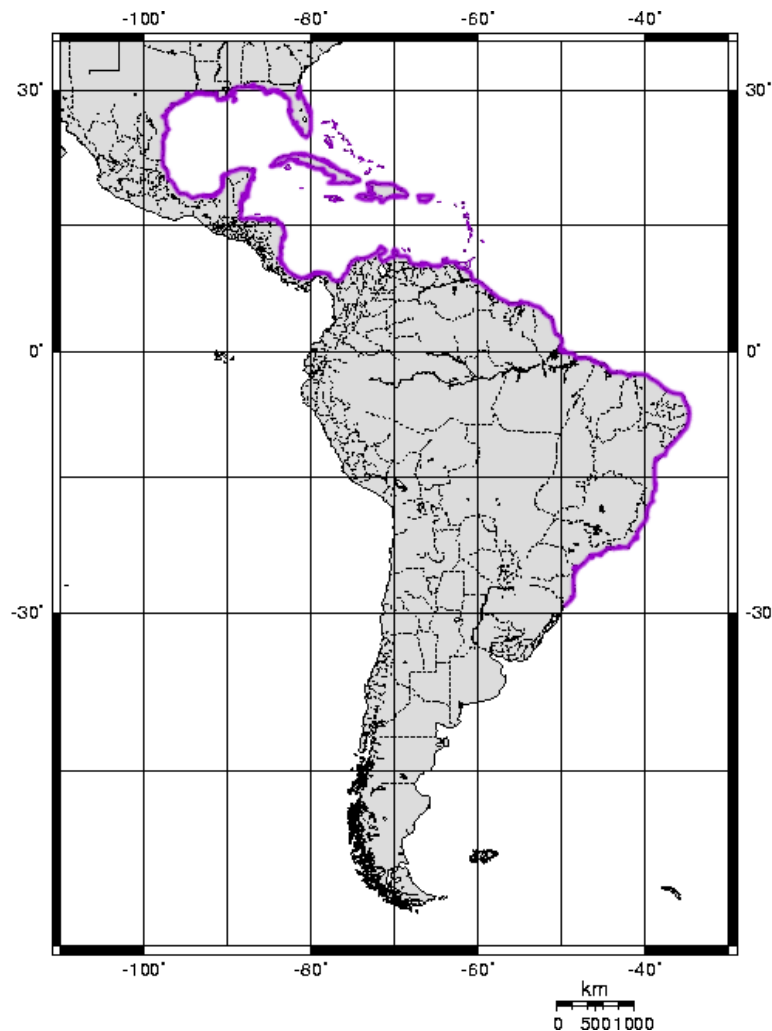


FIGURA 2- MAPA DO CONTINENTE AMERICANO COM A DISTRIBUIÇÃO DO CARANGUEJO *Ucides cordatus* (DEMARCADA PELA COR ROXA)

FONTE: Modificação do autor em mapa gerado por www.aquarius.geomar.de/omc (2008)

NOTA: Adaptado de DIELE (2000)

Em estudo realizado nos manguezais de Bragança (Pará, Brasil), Schories *et al.* (2003) sugeriu que o caranguejo-uçá é responsável por 67% do processo de degradação de folhas senescentes, seguido da exportação através da água e variações de maré (31%) e decomposição natural das folhas (2%). As populações deste caranguejo produzem largas porções de fezes finamente particuladas as quais são ricas em carbono, nitrogênio e biomassa bacteriana. Isso sugere que o armazenamento em tocas e consumo de folhas por *U. cordatus* influencia amplamente o fluxo de matéria orgânica, promovendo a retenção dos nutrientes e da energia dentro da floresta de manguezal (NORDHAUS, 2003). Considerando ainda que essa espécie representa um recurso alimentar para um grande número de espécies que habitam ou visitam regularmente os manguezais (guaxinins, macacos e algumas aves) (KOCH, 1999), o caranguejo-uçá representa uma espécie-chave nesses ecossistemas.

Um traço da intensa atividade biogênica do caranguejo *U. cordatus* é a abertura de galerias, que proporcionam a oxigenação e drenagem do sedimento (BLANKENSTEYN *et al.*, 1997). De acordo com Nordhaus (2003), essa oxigenação das camadas mais profundas de sedimento, coincide ainda com o incremento das abundâncias e biomassas microbianas, principais componentes do subsistema de decompositores, regulando a ciclagem de nutrientes, o fluxo de energia, a produtividade das plantas e dos ecossistemas (CARDOSO, 2004).

Dentre os diversos recursos naturais extraídos de manguezais, a captura de caranguejo-uçá é considerada a atividade econômica mais importante conduzida em escala comercial no Brasil, expressando assim, extrema relevância para economia doméstica das comunidades que vivem no entorno dos manguezais (KJERFVE e LACERDA, 1990 *apud* SCHORIES *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2004).

No norte e nordeste brasileiro, a exploração de *U. cordatus* reveste-se de grande importância social, uma vez que dela se ocupa um grande contingente de pessoas residentes em áreas costeiras próximas aos manguezais, gerando milhares de empregos diretos e indiretos. Glaser (2003) constatou que *U. cordatus* é coletado e vendido por 42% das famílias de 21 comunidades localizadas ao redor do estuário do Rio Caeté (Estado do Pará, Norte do Brasil), representando a principal fonte de renda para 38% destas famílias. No entanto, em função da estrutura de comercialização adotada (por meio de intermediários), os catadores de caranguejo tornaram-se grupos economicamente marginalizados, extremamente pobres, pouco

reconhecidos entre outros pescadores artesanais e, portanto, um segmento social de baixa qualificação profissional que depende deste recurso para sua subsistência (ALVES e NISHIDA, 2003).

A partir de 1997 (primeiro relato na cidade de Goiana, estado de Pernambuco), expressivas mortandades de caranguejo-uçá têm sido registradas por catadores de caranguejos e biólogos na maioria dos estados do Nordeste brasileiro incluindo Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia; e mais recentemente, abrangendo o estado do Espírito Santo, localizado na região Sudeste (FIGURA 3). Não havia registros de níveis tão altos de mortalidade desta espécie, o que provoca considerável interesse em relação aos impactos ambientais e sócio-econômicos desta epizootia nas comunidades dependentes deste recurso (ALVES e NISHIDA, 2003). Reduções de 84% e 97,6% dos estoques naturais de *U. cordatus* foram relatadas nos manguezais da Paraíba e Bahia, respectivamente, como consequência direta dessas mortandades (ALVES e NISHIDA, 2003; SCHMIDT, 2006).

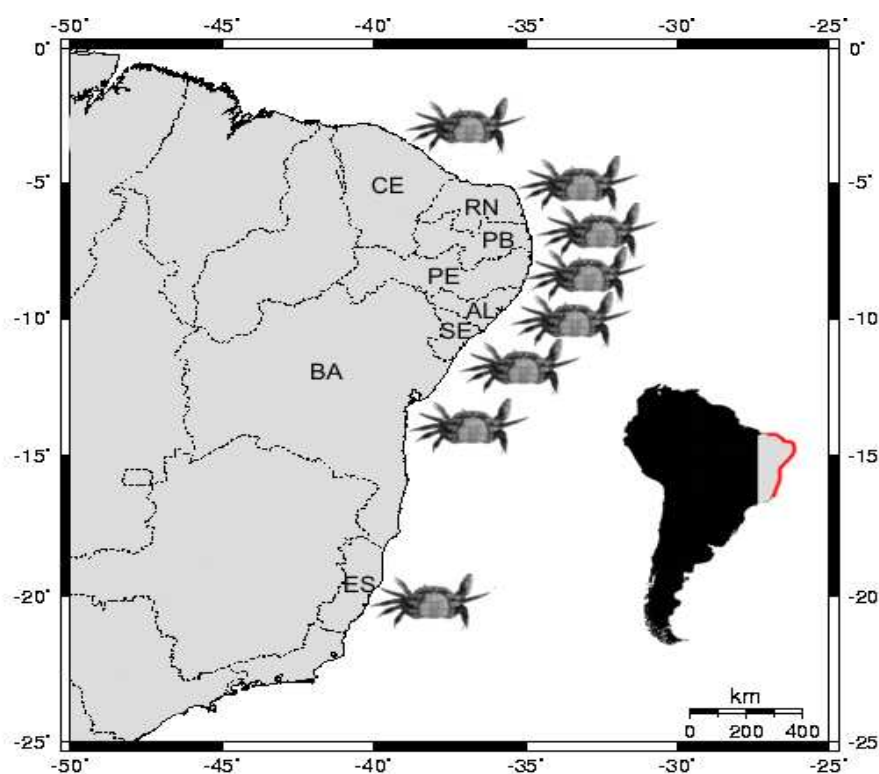


FIGURA 3- ESTADOS BRASILEIROS QUE APRESENTARAM REGISTROS DE EXPRESSIVAS MORTANDADES DE CARANGUEJO *Ucides cordatus*

FONTE: Modificações do autor em mapa gerado por www.aquarius.geomar.de/omc (2008)

Durante esses eventos de mortandades, os caranguejos moribundos compartilhavam diversos sintomas comuns, tais como: letargia, ataxia (dos pereiópodes e quelas) e inabilidade para retornar a posição correta quando virados. Em função desses sintomas característicos, a enfermidade foi batizada de Doença do Caranguejo Letárgico (DCL) (BOEGER *et al.*, 2005). De acordo com relatos dos catadores de caranguejos, os animais doentes tendem a sair de suas tocas antes de morrer, sendo geralmente encontrados com o cefalotórax para baixo. Alguns catadores relatam, ainda, que caranguejos moribundos apresentam tetania.

Uma variedade de potenciais agentes etiológicos têm sido correlacionados com a DCL, incluindo vírus, protistas, fungos, bactérias, introdução de metazoários exóticos e intoxicação química. Poluição de manguezais por esgotos domésticos, por subprodutos de usinas de açúcar e mesmo por derramamento de petróleo são outras hipóteses propostas para a origem da DCL. Em algumas regiões, a DCL está sendo associada aos cultivos de cana-de-açúcar (ALVES e NISHIDA, 2003) e criações de camarão (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2004). Entretanto, o único estudo científico que direciona a causa da DCL foi conduzido por Boeger *et al.* (2005).

Reconstruções filogenéticas com seqüências parciais do DNA ribossomal 18S – utilizando inferência Bayesiana, método de distância (NJ), parcimônia com pesagem e sem pesagem – inseriram o agente etiológico de *U. cordatus* dentro de um clado formado por espécies do filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina (BOEGER *et al.*, 2005). Estudos posteriores utilizaram a região ITS (espaçador transcrito interno), mais informativa interespecificamente em função de sua maior variabilidade (REVISTA DO GIA, 2006, p.14). Análises das seqüências resultantes, com o suporte de dados morfológicos (microscopia óptica e eletrônica de varredura), aproximaram a identidade do fungo associado a DCL (FIGURA 4) a espécies de *Exophiala*, mais especificamente, *Exophiala salmonis* Carmichael, 1966. Atualmente, estes resultados auxiliam os esforços de descrição formal desta espécie de fungo dematiáceo (em colaboração com Sybren De Hoog, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda) (BOEGER *et al.*, 2007).

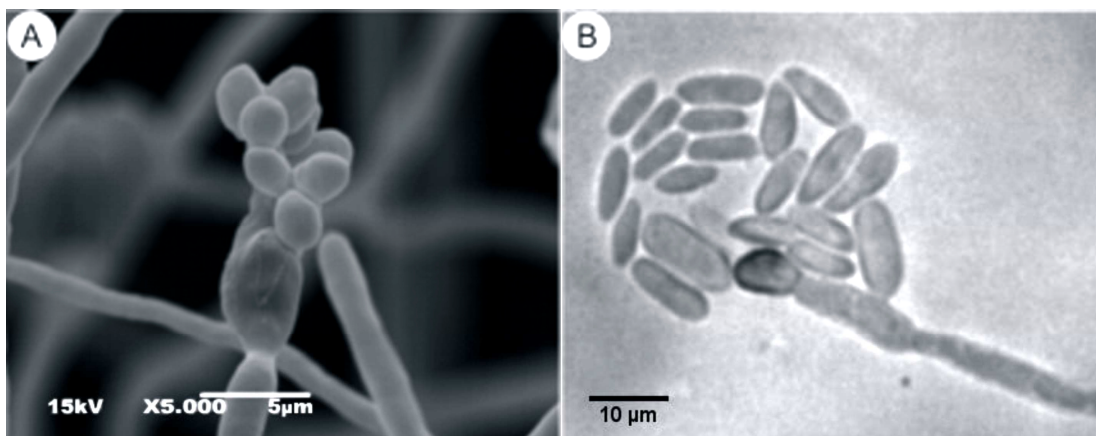


FIGURA 4 **(A-B)**- CONIDIOGÊNESE DO FUNGO DEMATIÁCEO ASSOCIADO A DCL: **(A)** MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E **(B)** MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, AMBAS EVIDENCIANDO CONÍDIOS OBOVÓIDES E CILÍNDRICOS.
FONTE: O autor (2008)

Fungos dematiáceos constituem um grande e heterogêneo grupo caracterizado por possuir pigmentação escura na parede das células vegetativas e reprodutivas (AL-DOORY, 1983; BAYLES, 1989; DIXON e POLAK-WISS, 1991). Frequentemente, o pigmento acumulado é a melanina, mais especificamente a diidrohinaftaleno (DHN) (DIXON e POLAK-WISS, 1991). Uma parcela destes hifomicetos de crescimento lento que formam colônias filamentosas de aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negras), onde microscopicamente observam-se hifas com septos escuros, podem apresentar durante o seu ciclo de vida um desenvolvimento leveduriforme, e por este motivo são também denominados de leveduras negras. Muitas espécies são sapróbias e de crescimento rápido, enquanto outras patogênicas, desenvolvem-se lentamente em meios de cultura definidos (KONEMAN e ROBERTS, 1985).

As leveduras negras são Ascomicetos e quase exclusivamente pertencem às ordens Dothideales e Chaetothyriales (HOOG e MCGINNIS, 1987). Membros desta última ordem apresentam um talo regular e uniformemente pigmentado, enquanto a melanização em leveduras negras da ordem Dothideales é dependente dos estágios de desenvolvimento ou das condições ambientais (HAASE *et al.*, 1999). A diferença na pigmentação pode ser uma das razões para que as formas potencialmente patogênicas sejam particularmente encontradas entre Chaetothyriales (Herpotrichiellaceae). A melanina contribui para a resistência destes fungos à resposta imune de seus hospedeiros e, portanto, é um importante fator de virulência dos mesmos (SCHNITZLER *et al.*, 1999). Em contraste, a habilidade adaptativa dos

membros de Dothideales capacita estes fungos para sobrevivência em condições ambientais hostis (STERFLINGER *et al.*, 1999).

Os fungos dematiáceos pertencentes à Herpotrichiellaceae são agentes etiológicos de uma variedade de infecções micóticas, incluindo Micetomas Eumicóticos, Feohifomicose e Cromoblastomicose, as quais podem permanecer nos locais de inoculação traumática, interiorizar-se ou disseminar-se (MONTERO-GEI *et al.*, 1970; AL-DOORY, 1983; MCGINNIS, 1983; HOOG, 1997). A grande maioria destas infecções são relatadas em humanos. No entanto, alguns estudos demonstram o potencial patogênico destas leveduras negras ao sistema nervoso de peixes marinhos e de água doce, causando letargia (OTIS *et al.*, 1985; HOOG *et al.*, 2000). Recentemente, foram registrados eventos de mortalidades em massa nos mexilhões *Bathymodiolus brevior*, cujo habitat está restrito a ecossistemas de grandes profundidades no oceano Pacífico (Nova Zelândia); o fungo dematiáceo responsável (*Capronia* sp.), causou uma pronunciada resposta imune do hospedeiro e a deterioração de seus tecidos (DOVER *et al.*, 2007).

Assim, o objetivo geral desse estudo é testar uma possível etiologia para DCL, gerar subsídios que auxiliem na construção de um cenário para compreensão do desenvolvimento e dispersão da mesma no ambiente natural e, além disso, analisar questões de saúde pública decorrentes desta enfermidade. Um esboço a respeito dos tópicos investigados nesta dissertação está representado na FIGURA 5.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo específico

Os objetivos específicos são:

(1) Avaliar, por meio de infecções experimentais, a patogenicidade da levedura negra isolada de caranguejos enfermos (*Exophiala* sp.), e testar a hipótese de Boeger *et al.* (2005, 2007) de sua associação com a DCL;

(2) Testar uma suposta origem viral da DCL;

(3) Realizar experimentos *in vitro* com o objetivo de testar a resistência do agente etiológico da DCL a diversas salinidades;

(4) Avaliar se caranguejos enfermos cozidos oferecem risco à saúde dos seus consumidores.

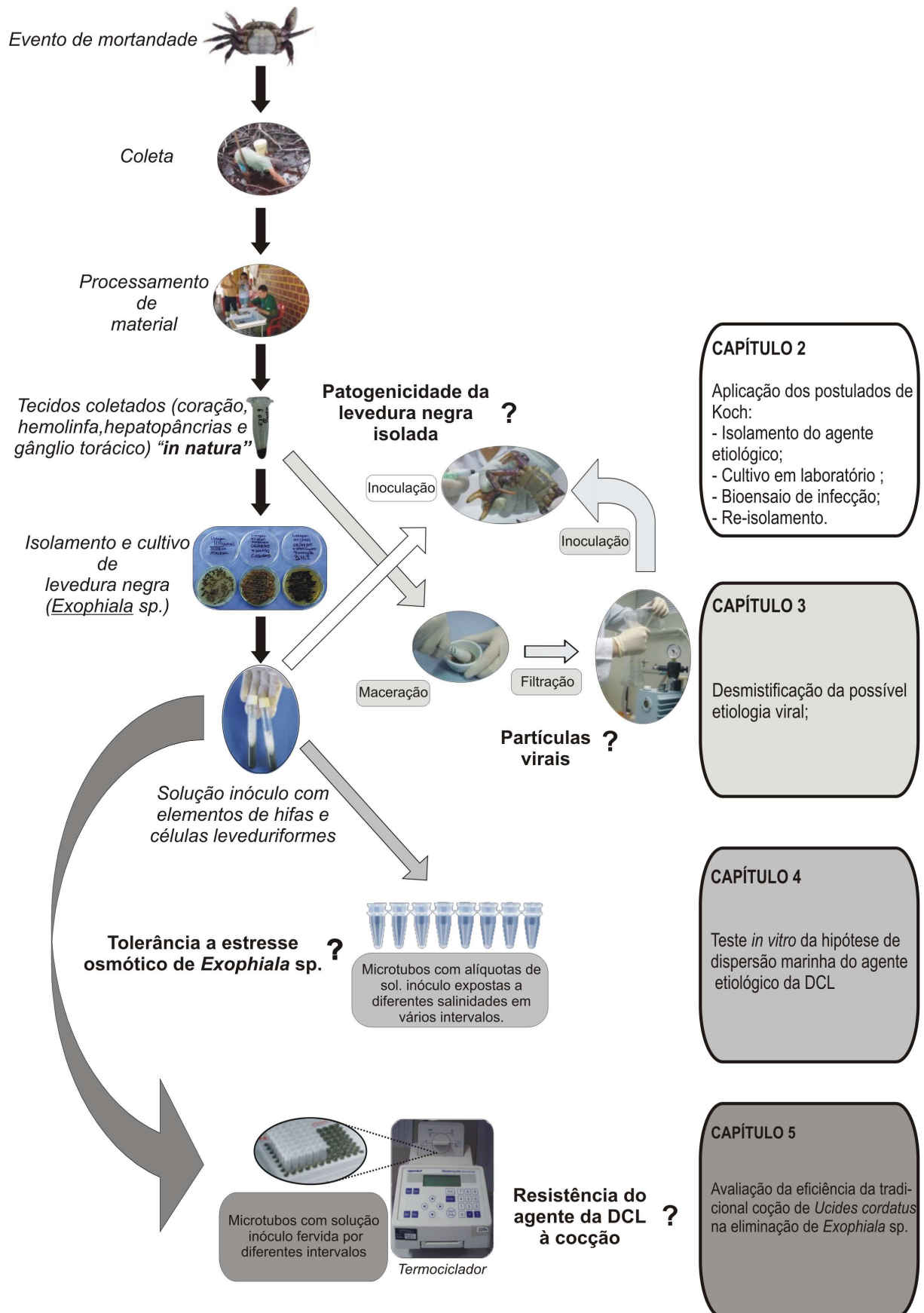


FIGURA 5- ESQUEMÁTICA VISTA GERAL DOS TÓPICOS ABORDADOS POR ESTA DISSERTAÇÃO
 FONTE: O autor (2008)

REFERÊNCIAS

- AL DOORY, Y. Chromomycosis. *In*: Di Salvo, A.F. **Occupational mycoses**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 95-121, 1983.
- ALVES, R. R. N.; NISHIDA, A. K. Socio-economical aspects and environmental perception of 'Caranguejo-uçá', *U. cordatus* (L. 1763) (Decapoda, Brachyura) gatherers in the Mamanguape river estuary, northeast Brazil. **Interciência**, v. 28, n. 1, p. 36-43, 2003.
- BAYLES, M. A. H. Chromomycosis. **Baillière's clinical tropical medicine and communicable diseases**, v. 4, n. 1, p. 45-70, 1989.
- BLANKENSTEYN, A.; CUNHA FILHO, D.; FREIRE, A. S. Distribuição, estoques pesqueiros e conteúdo protéico do caranguejo do mangue *Ucides cordatus* (L. 1763) (Brachyura: Ocypodidae) nos manguezais da Baía das Laranjeiras e adjacências, Paraná, Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n. 2, p. 331-349, 1997.
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 161-167, 2005.
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; VICENTE, V. A.; OSTRENSKY, A.; HUNGRIA, D.; CASTILHO, G. G. Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 73-81, 2007.
- CARDOSO, M. O. Métodos para quantificação da biomassa microbiana do solo. **Agropecuária Técnica**, v. 25, n. 1, 2004.
- COELHO, P. A.; RAMOS, M. A. A constituição e a distribuição da fauna de decápodes do litoral leste da América do Sul, entre as latitudes 5°N e 39°S. **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 13, p. 133-236, 1972.
- DIELE, K. **Life history and population structure of the exploited mangrove crab *U. cordatus* (L.) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil**. Bremen, Tese (Doutorado na área de especialidade 2 – Biologia/Química) - Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen, 103p., 2000.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, v. 34, p. 1–18, 1991.

DOVER, C. L. V.; WARD, M. E.; SCOTT, J. L.; UNDERDOWN, J.; ANDERSON, B.; GUSTAFSON, C.; WHALEN, M. E. CARNEGIE, R. B. A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent, **Marine Ecology**, v. 28, n. 1, p. 54-62, 2007.

GLASER, M. Interrelations between mangrove ecosystem, local economy and social sustainability in Caeté Estuary, North Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v. 11, p. 265–272, 2003.

GLASER, M.; DIELE, K. Asymmetric outcomes: assessing central aspects of the biological, economic and social sustainability of a mangrove crab fishery, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), in North Brazil. **Ecological Economics**, v. 49, p. 361-373, 2004.

HAASE, G.; SONNTAG, L.; MELZER-KRICK, B.; HOOG, G. S. DE. Phylogenetic inference by SSU gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 80–97, 1999.

HOOG G. S. DE. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycoses**, v. 40, n. 2, p. 5–8, 1997.

HOOG G. S. DE; GUARRO J.; GENÉ J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili, Baarn/ Reus, ed. 2º, 720 p., 2000.

HOOG, G. S. DE; MCGINNIS, M. R. Ascomycetous black yeasts, p. 187–199. In: **The expanding realm of yeast-like fungi**. Elsevier, Amsterdam, 1987.

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D. Mangroves of Brazil. **Marine Biology**, p. 245–272. 1990.

KOCH, V. **Epibenthic production and energy flow in the Caeté mangrove estuary, North Brazil**. PhD thesis, University of Bremen (Saint-Paul). ZMT Contribution 6. 97 p., 1999.

KONEMAN, E. W.; ROBERTS, G. D. **Practical Laboratory Mycology**, ed. 3°, Williams & Wilkins, 1985.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 8, p. 1-16, 1983.

MELO G. A. S. **Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo. FAPESP, 604p., 1996.

MELO, G. A. S. Brachyura: Oxyrhyncha and Brachyrhyncha. *In*: Paulo S. Young. (Org.). **Catalogue of Crustacea of Brazil**, ed. 1°, Rio de Janeiro, RJ.: Museu Nacional, v. 1, p. 1-717, 1998.

MONTERO-GEI, F. Ecology and epidemiology of chromoblastomycosis. *In*: International symposium on mycosis, Washington. **Proceedings Washington: Pan American Health Organization**, p. 182-184, 1970.

NORDHAUS, I. **Feeding ecology of the semi-terrestrial crab *U. cordatus* (Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil**. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen, 217p., 2003.

OTIS E. J.; WOLKE R. E.; BLAZER; V. S. Infection of *Exophiala salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 21, n. 1, p. 61-64, 1985.

REVISTA DO GIA (GRUPO INTEGRADO DE AQUICULTURA E ESTUDOS AMBIENTAIS). **Desvendando uma tragédia nos manguezais brasileiros**, vol. 2, p. 49, <http://gia.locaweb.com.br/paginas/index.php?p=publicações&id=34>, 2006.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ADAIME, R. R. Variability mangrove ecosystem along Brazilian coast. **Estuaries**, v. 3, n. 2, p. 204-218, 1990.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO. G.; COELHO-JR, C.; ALMEIDA, R.; MENGHINI, R.P. A mortandade de caranguejo-do-mangue no Nordeste do Brasil: Evidências circunstanciais para uma epizootia com origem relacionada à produção de camarão peneídeo marinho. **II Simpósio Brasileiro de Oceanografia**, São Paulo, 2004.

SCHMIDT, A. J. **Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul da Bahia.** Dissertação de Mestrado em Oceanografia Biológica, IOUSP, São Paulo, 199p., 2006.

SCHNITZLER, N.; PELTROCHELA-LLACSAHUANGA, H.; BESTIER, N.; ZUNDORF, J.; LUTTICKEN, R.; HAASE, G. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst and killing by human neutrophils. **Infection Immunity**, v. 67, p. 94-101, 1999.

SCHORIES, D.; BARLETTA-BERGAN, A.; BARLETTA, M.; KRUMME, U.; MEHLIG, U.; RADEMAKER, V. The keystone role of leaf-removing crabs in mangrove forests of North Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v. 11, p. 243–255, 2003.

STERFLINGER, K.; HOOG, G. S. DE; HAASE, G. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 98–106, 1999.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E. F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crab *Ucides cordatus*. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 4, p. 179-182, 2004.

2 DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO: TESTE DE PATOGENICIDADE *IN VIVO* EM *Ucides cordatus* (DECAPODA: OCYPODIDAE)

RESUMO

Devido o expressivo rigor científico fomentado por sua metodologia, os Postulados de Koch são considerados por mais de um século padrão ouro em investigações que tem por finalidade comprovar que um determinado microrganismo é a causa de uma doença. Portanto, o presente estudo objetivou cumprir esses postulados com o fim de corroborar a associação de uma levedura negra (*Exophiala* sp.) à etiologia da Doença do Caranguejo Letárgico (DCL). Para isso, foram realizados bioensaios de infecções artificiais (contínuas e não-contínuas) em animais sadios, analisadas as taxas de mortalidade, realizados estudos histopatológicos dos principais tecidos e, por fim, re-isolamento e identificação do agente etiológico. Os caranguejos pertencentes aos ensaios de infecção contínua e não-contínua apresentaram, respectivamente, 60% e 50% (n=6 e n=5) de mortes, ao contrário dos animais controle, onde elas foram quase nulas (n=1). Os espécimes moribundos apresentaram comportamento semelhante àquele observado no ambiente em animais enfermos com DCL, incluindo letargia, tetania e ataxia. As análises histopatológicas demonstraram-se compatíveis a esses sinais clínicos. A aplicação de marcadores moleculares específicos mostrou-se eficiente na identificação de *Exophiala* sp. em todas amostras de tecido infectados e cultivos. Suportou-se, assim, a hipótese que responsabiliza *Exophiala* sp. pelos eventos de mortandade de caranguejos-uçá, uma vez que esta levedura negra, apresentou um notável grau de patogenicidade a este hospedeiro.

Palavras-chave: Postulados de Koch. *Exophiala* sp. DCL.

2.1 INTRODUÇÃO

A maior dificuldade encontrada em uma investigação a respeito do agente etiológico de uma determinada doença infecciosa é a distinção entre agentes primários (patógenos) e secundários (oportunistas) no organismo morto ou moribundo em decorrência desta enfermidade. Defronte a esta questão, em 1884 Koch formulou quatro postulados, refinando-os e publicando-os (KOCH, 1884). Os Postulados de Koch são utilizados até hoje, mesmo que em certas circunstâncias seja impossível aplicá-los (SPARKS, 1982). Esses postulados definem o seguinte:

1. Um microrganismo específico (patógeno) deve estar consistentemente associado a uma determinada enfermidade, não estando presente em hospedeiros saudáveis;

2. O agente etiológico suspeito deve ser isolado de um animal doente e cultivado em laboratório (*in vitro*);
3. Culturas puras deste microrganismo cultivado, quando inoculadas em um animal de laboratório saudável (hospedeiro suscetível), devem causar a mesma doença observada no animal original;
4. O microrganismo patogênico deve ser re-isolado do animal infectado experimentalmente.

Há mais de 120 anos após serem primeiramente propostos, os postulados de Koch ainda permanecem como padrão ouro nesse tipo de pesquisa. Embora avanços na microbiologia desde o século 19 tenham conduzido a re-interpretações modernas (FALKOW, 2004), os postulados de Koch, e o rigor científico que eles fomentam, ainda fornecem uma incomensurável assistência nos esforços para provar que um determinado microrganismo é a causa de uma doença (EDITORIAL, 2006).

Dentre as diversas infecções existentes, as de suspeito caráter micológico merecem uma cautela especial no que diz respeito ao cumprimento desses postulados. Atualmente, é relativamente alto o número de espécies de fungos conhecidas como agentes causadores de micoses. Entretanto, uma grande parte delas é oportunista, restando aos fungos patogênicos primários uma limitada parcela. De acordo com Hoog e Guarro (1995), os fungos definidos como oportunistas habitam essencialmente nichos ecológicos não-animais, ocorrendo no tecido dos mesmos por acaso. Contudo, os fungos patogênicos primários são capazes de causar micoses sistêmicas em animais saudáveis. Isto sugere que patogenicidade, definida por estes autores como a capacidade de um fungo obter vantagens evolutivas por utilizar um substrato animal durante parte do seu ciclo de vida, trata-se de uma rara adaptação encontrada em uma restrita parte do reino Fungi. Desta forma, torna-se compreensiva a extensa quantidade de estudos direcionados a corroboração de infecções primárias procedentes de fungos, entre elas, aquelas causadas por fungos dematiáceos, que afetam diversos organismos como peixes marinhos e de água doce, aves domésticas e selvagens, gatos, cachorros, além de seres humanos (DIXON e POLAK-WYSS, 1991; KRALOVIC e RHODES, 1995; OHORI *et al.*, 2005).

Recentemente, Boeger et al. (2005) detectaram e isolaram uma espécie de fungo dematiáceo (*Exophiala* sp.) consistentemente associado a diferentes eventos

epizoóticos de mortandade de caranguejos *Ucides cordatus* (estados de Sergipe e Bahia), preenchendo assim os primeiros requisitos imprescindíveis à análise etiológica da denominada Doença do Caranguejo Letárgico (DCL). Em Boeger *et al.* (2007), análises histológicas foram realizadas em animais moribundos e grandes quantidades de células leveduriformes e hifas, livres ou em nódulos (frequentemente melanizados) foram descritas nas brânquias, coração, gânglio torácico e hepatopâncreas. Dentre as patologias observadas nestes tecidos destaca-se a destruição ou fragmentação das fibras musculares do coração, a ruptura das lamelas branquiais, a extensiva necrose do hepatopâncreas e gânglio torácico, assim como a compressão das fibras nervosas por células leveduriformes. Na epiderme e tecido conectivo associado ao exoesqueleto, observou-se uma notável desorganização associada a grande acumulação de células leveduriformes (BOEGER *et al.*, 2007).

Apesar de tratar-se de uma ferramenta frequentemente inespecífica na diagnose de enfermidades, as análises histopatológicas mantêm-se indispensáveis nestes estudos, pois possibilitam visualizar o grau e a extensão das infecções. Para isto, é necessário um prévio conhecimento dos mecanismos de defesa imunes celulares executados por um determinado hospedeiro.

No caso dos caranguejos semiterrestres *Ucides cordatus*, a remoção de partículas estranhas da hemocele é realizada por meio de funções de defesa celular como fagocitose (via clássica de defesa) e atividades de infiltração, encapsulação e melanização (TERWILLIGER, 2007). A fagocitose é realizada por células circulantes e/ou fixas; nos decápodes, fagócitos fixos são observados na superfície das ramificações terminais de artérias do seio hemal do hepatopâncreas (FACTOR e BEEKMAN, 1990). As infiltrações de hemócitos são sucedidas por encapsulações, processos nos quais vários hemócitos cobrem a partícula estranha formando capas ao redor da mesma, provocando assim sua morte, a qual é atribuída a uma ação tóxica por meio de quinonas ou por asfixia celular (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992). A melanização trata-se de um processo químico em cascata, representando tipicamente uma resposta da encapsulação para isolamento de grandes corpos invasores estranhos ou reparo de danos teciduais. Nos hemócitos, do tipo semi-granulócito e granulócito, é encontrada uma pró-enzima inativa denominada profenoloxidase (proFO). Componentes da parede celular de bactérias (lipopolissacarídeos e peptidoglicanos), fungos (β -1,3 glucanos) e de, presumivelmente, alguns metazoários invasores, ativam esta pró-enzima, gerando

fenoloxidasas. Estas são elementos chave para melanização, pois acionam uma complexa cascata de enzimas e de outras proteínas que estão envolvidas diretamente nesse processo (JOHANSSON e SÖDERHÄLL, 1989).

Atualmente, outras ferramentas indispensáveis a investigações etiológicas, são as técnicas diagnósticas moleculares baseadas na premissa de que cada espécie patogênica carrega seqüências únicas de DNA. Além desta especificidade, essas metodologias estão associadas a outras vantagens tais como rapidez (resultados após algumas horas), confiabilidade (apresenta controles positivos e negativos) e sensibilidade (necessita de baixas concentrações de DNA para sua aplicação) (FAO, 1999). Vantagens extensamente exploradas na identificação, por exemplo, de fungos dematiáceos de importância médica por meio de uma técnica que permite a amplificação de um segmento específico do DNA, denominada PCR (reação em cadeia da polimerase). Nesses estudos, marcadores são baseados em uma região específica do DNA ribossomal (DNAr) das leveduras negras, denominada ITS (espaçador transcrito interno). Essa região encontra-se entre os segmentos 18S (subunidade menor) e 28S (subunidade maior), sendo subdividida em dois espaçadores, ITS1 e ITS2, separados pela região conservada 5.8S. Estes espaçadores são conhecidos por exibir uma alta taxa de mutação em relação aos DNAr 18S, 5.8S e 28S (FIGURA 6) (HOOG *et al.*, 1998; SUGITA *et al.*, 1998; LINDSLEY *et al.*, 2001; ABLIZ *et al.*, 2003; ABLIZ *et al.*, 2004).

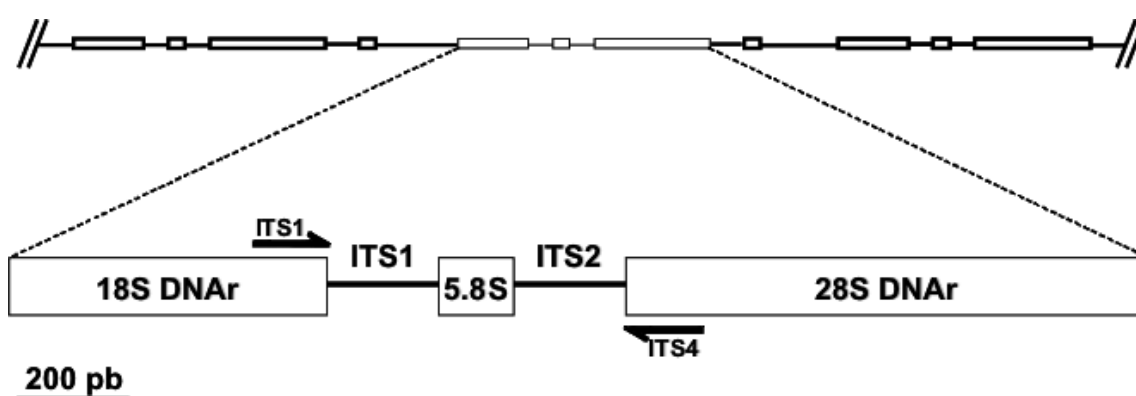


FIGURA 6- ESTRUTURA DO GENE DNAr QUE CODIFICA O RNAr E POSIÇÕES DOS PRINCIPAIS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES APLICADOS À FUNGOS NA PCR (ITS 1 E 4). O CONJUNTO É DIVIDIDO EM REGIÕES CODIFICADORAS (18S, 5.8S E 28S) E NÃO-CODIFICADORAS (ITS). A POSIÇÃO APROXIMADA DOS INICIADORES E SUAS DIREÇÕES DE SÍNTESE ESTÃO INDICADAS POR SETAS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Adaptado de LINDSLEY *et al.* (2001)

Estudos realizados pelo Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais (GIA) (REVISTA DO GIA, 2006, p. 14) compararam a sequência de DNAr (região ITS) obtida do fungo dematiáceo isolado dos *U. cordatus* moribundos com várias outras seqüências de leveduras negras e outros fungos, o que permitiu visualizar as regiões de máxima dissimilaridade (transversões e inserções) as quais foram utilizadas na confecção de iniciadores específicos. Estes marcadores moleculares exibiram uma excelente sensibilidade, detectando 0,005 ng de DNA do fungo, e especificidade, testada através da sua aplicação em várias amostras de outras espécies de fungos (*Cladophialophora* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Fonsecaea pedrosoi*). Tais características permitem que estes marcadores sejam aplicados na diagnose de caranguejos doentes e identificação de culturas isoladas de tecidos infectados (GIA, dados não publicados).

Conseqüentemente, o atual cenário da DCL é composto por uma hipótese de associação de sua etiologia a uma levedura negra (*Exophiala* sp.) isolada em culturas laboratoriais, cujos padrões histopatológicos no caranguejo-uçá já são conhecidos e, para a qual, marcadores moleculares específicos foram desenvolvidos.

Portanto, o propósito fundamental desta dissertação é avaliar, por meio de bioensaios de infecção utilizando estas culturas puras laboratoriais e caranguejos-uçá sadios, a patogenicidade do fungo (*Exophiala* sp.) isolado de espécimes de *U. cordatus* moribundos. Se o perfil das taxas de mortalidade dos tratamentos experimentais corroborarem uma alta virulência do fungo dematiáceo estudado, sua responsabilidade sobre a expressão da DCL será confirmada (FIGURA 7).

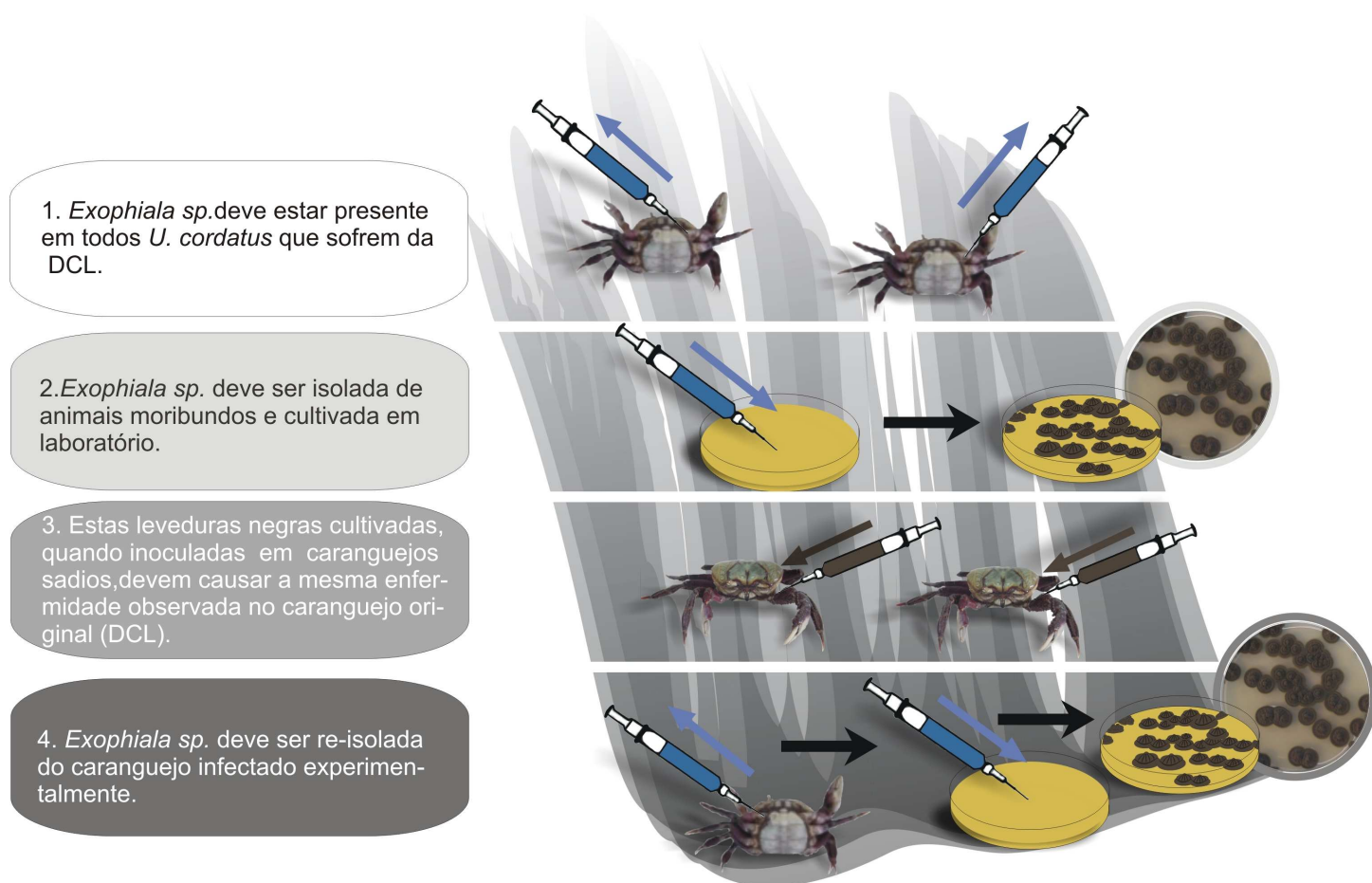


FIGURA 7- ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS POSTULADOS DE KOCH NO CONTEXTO DA DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO
FONTE: O autor (2008)

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de material biológico, isolamento e identificação do agente patogênico

Os caranguejos-uçá enfermos foram coletados por catadores em diversas localidades do estado de Sergipe e também da Bahia (FIGURAS 8,9) no início de 2004 e 2005, uma vez que as mortandades vêm ocorrendo nessa época do ano em vários estados nordestinos.

Localidade	Coordenadas	Data	Nº (amostras)	Salinidade (ppm)
Garapua (BA)	13°28'26,1`` 38°54'49,7``	03/jan/2004	12	-
Brejão (SE)	10°31'56,9`` 36°29'27,1``	17/mai/2004	6	2
Brejão (SE)	10°32'14,7`` 36°30'44,9``	19/mai/2004	6	2
Areia Branca (SE)	11°03'46,1`` 37°08'17,8``	17-18/mai/2004	4	23
Crastro (SE)	11°25'02,2`` 37°24'52,6``	19/mai/2004	5	20
Taiçoca de Fora (SE)	11°25'02,1`` 37°24'52,7``	21/mai/2004	4	15
Caravelas (BA)	17° 42.595' 39° 18.256'	2-3/fev/2005	34	-

FIGURA 8- LOCAIS, COORDENADAS, DATAS DE COLETA, NÚMERO DE CARANGUEJOS AMOSTRADOS E SALINIDADE LOCAL

FONTE: O autor (2008)

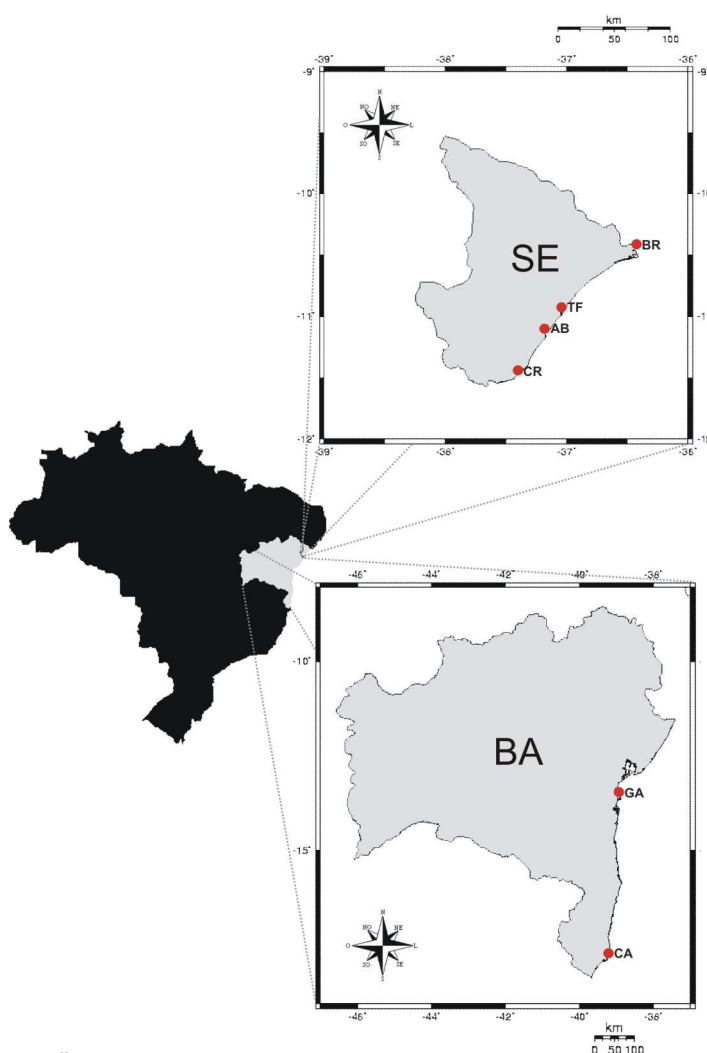


FIGURA 9- DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE *Ucides cordatus* NOS ESTADOS DE SERGIPE (SE) E BAHIA (BA). AB = AREIA BRANCA; BR = BREJO GRANDE; CA = CARAVELAS; CR = CRASTRO; GA = GARAPUÁ; TF = TAIÇOCA DE FORA

FONTE: O autor (2008)

Os animais capturados foram imediatamente submetidos a um teste projetado para avaliar sua condição de higidez (índice de higidez). Este teste foi executado virando cada caranguejo com o dorso da carapaça para baixo e medindo-se o tempo necessário para retornar à posição correta (FIGURA 10). Os animais incapazes de recuperar-se após 30 segundos (5 repetições) foram classificados moribundos. Caranguejos mortos não foram coletados (BOEGER *et al.*; 2005, 2007).

Tempo médio de recuperação (em segundos)	Índice de higidez	Categorias	Número de caranguejos
0-2	0	Excelente	7
2-3	1	Sadio	4
3-5	2	Intermediário	5
5-30	3	Comprometido	2
30-999	4	Moribundo	5

FIGURA 10- TEMPO MÉDIO DE RECUPERAÇÃO DE *Ucides cordatus* VIRADOS COM O DORSO DA CARAPAÇA PARA BAIXO E OS RESPECTIVOS ÍNDICES DE HIGIDEZ ASSOCIADOS AO NÚMERO DE ANIMAIS DETECTADOS DENTRO DE CADA CATEGORIA

FONTE: BOEGER *et al.* (2005, 2007)

As amostras de brânquias, coração, hemolinfa, hepatopâncreas e gânglio torácico coletadas sofreram um processamento de fixação adequado a cada metodologia; fixação em AFA (ANEXO, item 5) para análises histológicas, em DMSO-EDTA (ANEXO, item 6) para processamento molecular e no gelo (*in natura*), para isolamento e cultivo em meio de cultura específico (ANEXO, item 2) de acordo com o método de Iwatsu *et al.* (1981).

O material destinado às análises microbiológicas (hepatopâncreas, gânglio torácico e coração) foi inoculado em uma solução de óleo mineral e antibióticos (ciclohexamida, cloranfenicol, estreptomicina e penicilina). Posteriormente, o produto coletado da interfase desta solução foi semeado em um meio seletivo (Mycosel) para a detecção de fungos dematiáceos (IWATSU *et al.*, 1981). Colônias com características macroscópicas de leveduras negras foram repetidamente subcultivadas até a fase filamentosa ser obtida (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1982). Posteriormente, a linhagem adquirida foi estocada em Ágar Sabouraud Dextrosado (ANEXO, item 3) no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná.

A identificação em nível genérico do agente etiológico putativo (*Exophiala* sp.) foi realizada inicialmente com base na morfologia das colônias e estudo da

conidiogênese, por meio de microscopia óptica de contraste de fase (Olympus BX51), interferência (Olympus BX51) e eletrônica de varredura (JSM 6360LV, Jeol), após crescimento em Ágar Sabouraud Dextrosado (ANEXO, item 3) na temperatura de 28°C. Em virtude do elevado pleomorfismo (sinanamorfias) do gênero *Exophiala*, apresentando ciclos de vida anamorfos com vários tipos divergentes de propagação (HOOG *et al.*, 1994), critérios moleculares adicionais (seqüenciamento de regiões espaçadoras transcritas internas – ITS, e intergênicas - IGS) estão sendo empregados por Vicente, V. A.¹ e Hoog, G. S. de² para identificação em nível infra-genérico da espécie estudada.

2.2.2 Teste de patogenicidade

2.2.2.1 Bioensaio de infecção contínua e não - contínua *in vivo*

Os experimentos descritos foram realizados no Laboratório de Aquários do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Os animais experimentais foram mantidos individualmente em caixas de plástico de aproximadamente 50 Litros, com água do mar (15 Litros, salinidade de 25 ppm), aeração permanente (compressor de ar Schulz) e temperatura controlada (cerca de 25°C) (FIGURA 11). A alimentação foi realizada semanalmente *ad libitum* com carne de peixe; troca de cerca de 50% da água foi executada a cada 2 dias. Em todos experimentos utilizaram-se caranguejos-uçá sadios, coletados no litoral paranaense (Ilha das Peças, Baía de Antonina) (FIGURA 12), área não atingida pelas mortandades causadas pela DCL (FIGURA 13).

¹Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht; Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Universidade de Amsterdam, Amsterdam, Holanda.

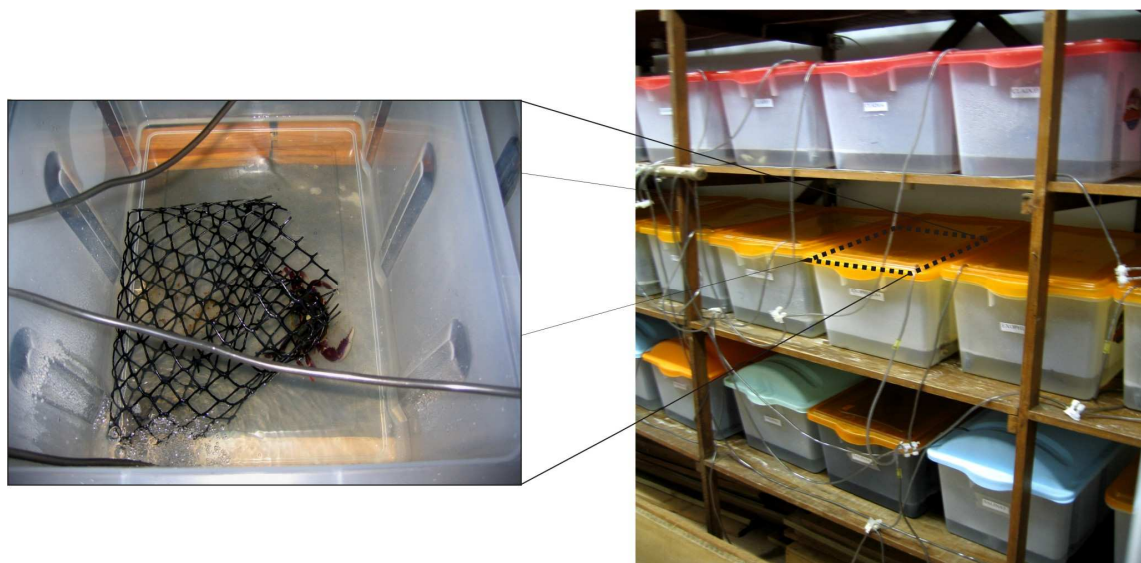


FIGURA 11- RECIPIENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE INFECÇÃO CONTÍNUA E NÃO-CONTÍNUA PARA ALOJAMENTO DOS CARANGUEJOS
FONTE: O autor (2008)

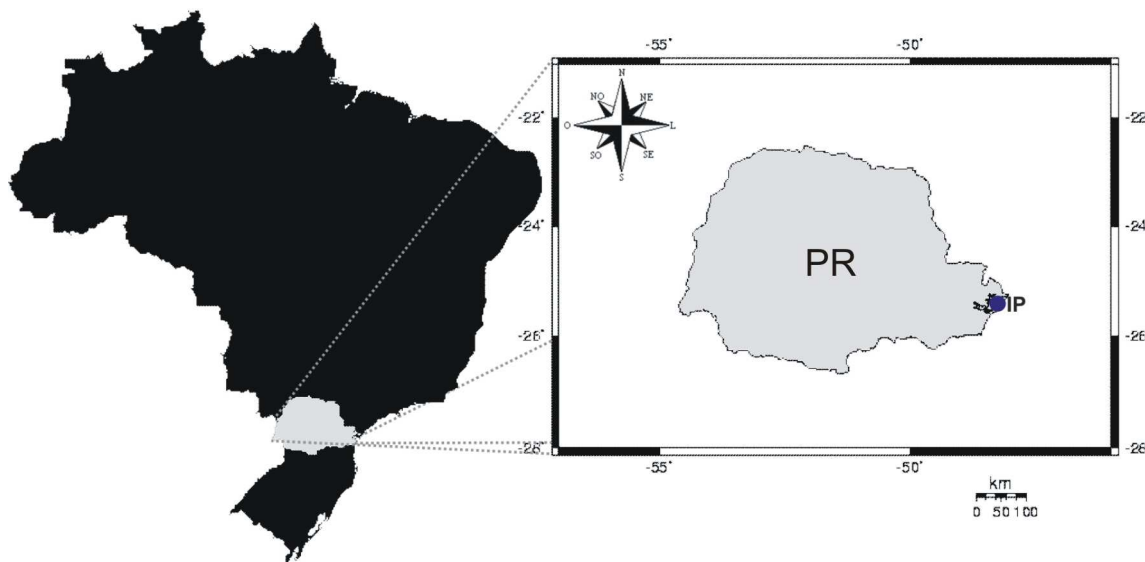


FIGURA 12- LOCALIZAÇÃO DO PONTO DE COLETA DE CARANGUEJOS-UÇÁ SADIOS. IP = ILHA DAS PEÇAS, BAÍA DE ANTONINA, PARANÁ
FONTE: Modificações do autor em mapa gerado por www.aquarius.geomar.de/omc (2008)

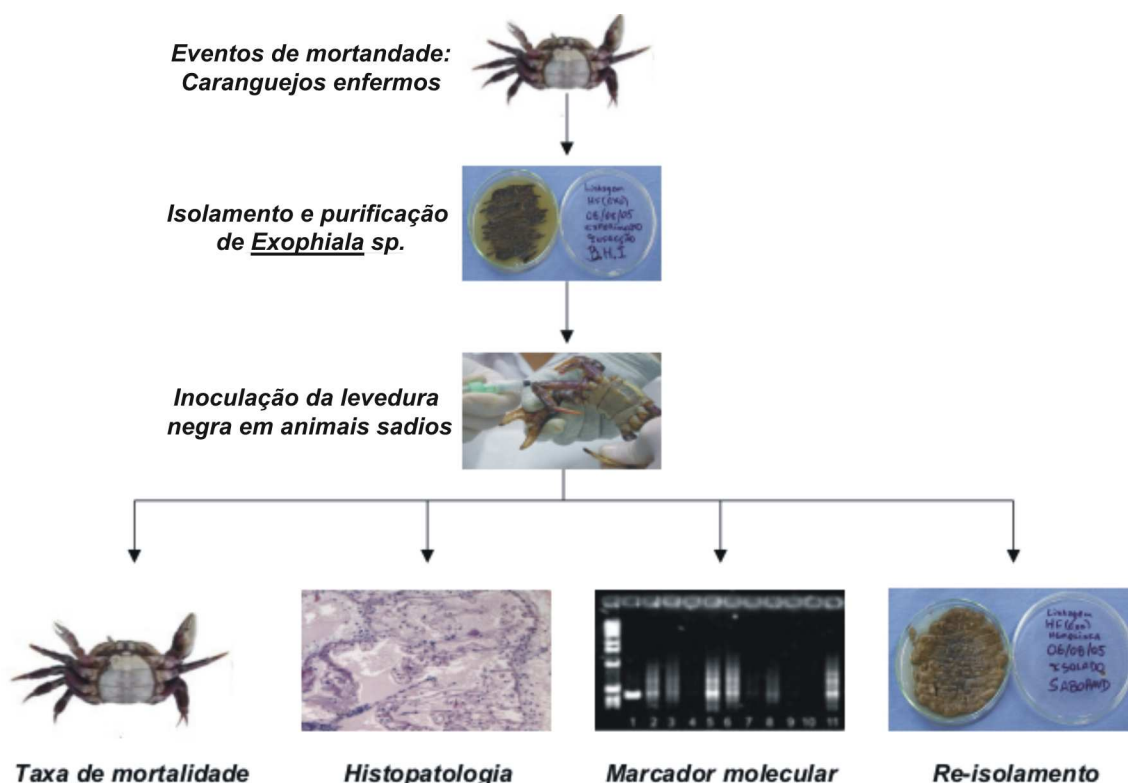


FIGURA 13- ESQUEMA GERAL DAS METODOLOGIAS APLICADAS NOS BIOENSAIOS

FONTE: O autor (2008)

Para realização dos experimentos, a linhagem de *Exophiala* isolada dos caranguejos moribundos foi cultivada em Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) (ANEXO, item 1) a 28°C durante 2 semanas (FIGURA 14). Neste período, os *U. cordatus* coletados em Antonina foram submetidos à aclimação. Um total de 27 animais foi utilizado nas réplicas dos testes de patogenicidade – infecção contínua e não-continua. A densidade de unidades formadoras de colônias utilizadas nos experimentos foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer - Optik Labor, com auxílio de microscópio de contraste de fase (Olympus BX51) em aumento de 400x, seguido de diluição (manipulações efetuadas em fluxo laminar - LabCon Co. Purifier Class II). Esses animais foram divididos em 3 conjuntos (1 tratamento e 2 controles): (1) 10 espécimes foram injetados com 1 mL de solução inóculo (ANEXO, item 7) (adaptado de IWATSU *et al.*, 1981) contendo 2×10^7 elementos de micélio e células leveduriformes de *Exophiala* sp.; (2) 8 espécimes foram submetidos à injeção de 1mL de solução salina 2,5% (ANEXO, item 8) (salinidade da hemolinfa de *U. cordatus*) (HARRIS e SANTOS, 1993) contendo Tween® 20 (0,05 mL); e (3) outros 8 animais foram mantidos nas caixas experimentais sem manipulação, após serem submetidos ao estresse provocado

pela inserção da agulha de injeção. Todas as injeções (seringas Injex, 5 mL) foram aplicadas nas membranas artrodiais dos caranguejos, situadas na junção da base dos pereiópodes com a carapaça. As réplicas dos experimentos foram realizadas da mesma forma, diferindo apenas na quantidade de injeções da solução inóculo, maior nos bioensaios de infecções contínuas (realizadas no 1º, 14º e 20º dias).

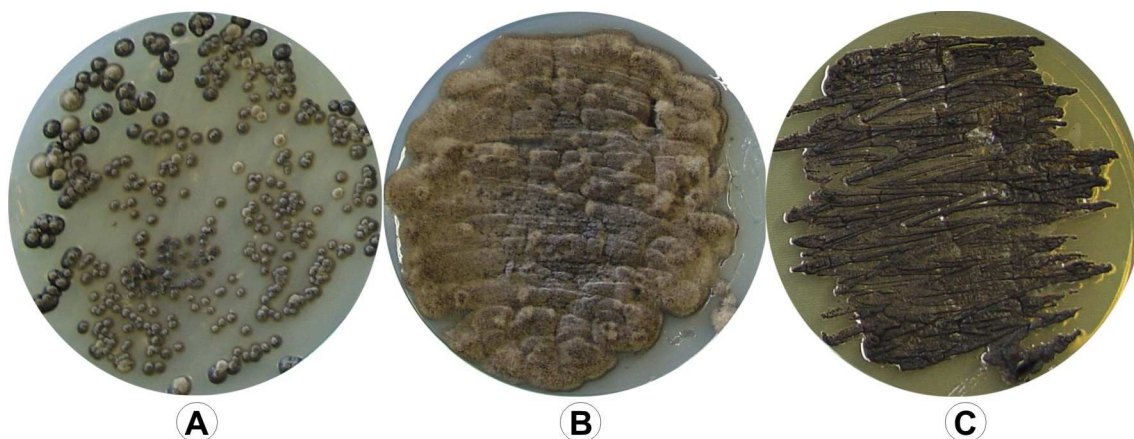


FIGURA 14 (A-C)- MACROMORFOLOGIA DO FUNGO *Exophiala* sp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APRESENTANDO O DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS LEVEDURIFORMES RESULTANTES DO ISOLAMENTO DE *Exophiala* sp. EM ESFREGAÇOS NO MEIO MYCOSEL (A) DE TECIDOS DE *U. cordatus* INFECTADOS DURANTE EVENTOS DE MORTANDADE (SERGIPE E BAHIA) E POSTERIOR DESENVOLVIMENTO MICELIAL DESTA LINHAGEM QUANDO REPICADA EM MEIO SABOURAUD (B) E BHI (C).

FONTE: O autor (2008)

Para o estudo das taxas de mortalidades, o grau de higidez dos animais infeccionados foi verificado duas vezes ao dia, durante o desenvolvimento dos experimentos, por meio do teste de higidez citado anteriormente (BOEGER *et al.*; 2005, 2007). Amostras de brânquias, coração, gânglio torácico, hemolinfa e hepatopâncreas foram coletadas dos animais mortos ou sacrificados (após 30 dias, término dos experimentos) (FIGURA 15). O material biológico coletado sofreu um processamento de fixação adequado ao objetivo metodológico subsequente; fixação em AFA (HUMASON, 1979) para análises histológicas (brânquias, coração, gânglio torácico e hepatopâncreas), em tampão DMSO-EDTA para aplicação do protocolo de diagnose molecular (aplicação dos marcadores específicos em fragmentos de coração e hepatopâncreas) e resfriamento (2 a 4°C) para análises microbiológicas (re-isolamento do fungo no coração, gânglio torácico, hemolinfa e hepatopâncreas). As carcaças destes caranguejos foram incineradas em biotério (UFPR), e a água de seus respectivos tanques sofreram um processo de descontaminação por meio de Hipoclorito de Sódio (NaClO) 1%.

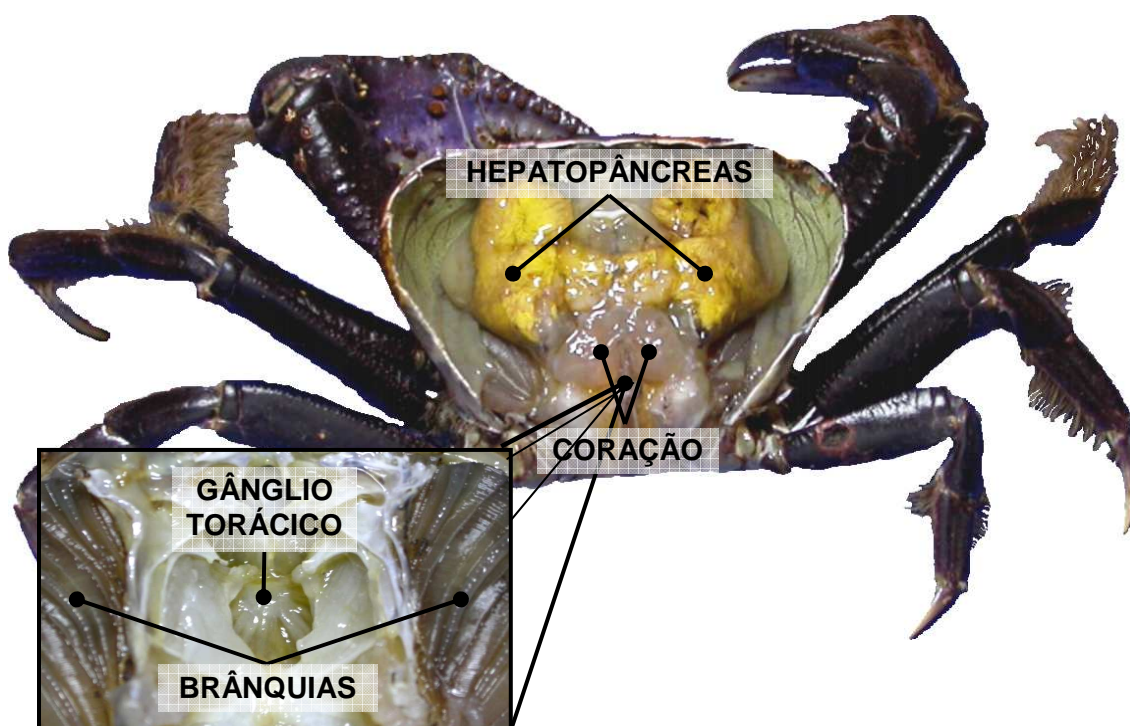


FIGURA 15- CORTE LONGITUDINAL DO CEFALOTÓRAX DE *U. cordatus*, COM DESTAQUE PARA OS TECIDOS COLETADOS

FONTE: O autor (2008)

2.2.2.2 Histologia

A confecção de cortes histológicos dos órgãos de caranguejos infectados artificialmente teve como objetivo a prospecção de formas de propagação do fungo. Brânquias, corações, gânglios torácicos e hepatopâncreas foram retirados e posteriormente submetidos ao processamento de rotina (BEÇAK e PAULETE, 1976), sendo desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados em xileno, com posterior impregnação e inclusão em parafina histológica purificada. Os blocos foram trimados e seccionados em micrótomos. Os cortes foram realizados com a espessura de 5 μ m e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) e Periodic Acid Schiff (PAS) para a descrição histológica e histoquímica dos cortes (HOROBIN e BANCROFT, 1998). Procedimentos efetuados no Laboratório de Histologia do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA).

2.2.2.3 Identificação molecular

O marcador molecular específico (par de iniciadores) para a levedura negra da DCL (*Exophiala* sp.) foi aplicado em extratos de tecidos de alguns órgãos dos animais que morreram, com o objetivo de confirmar a presença e a identidade dos fungos visualizados nas análises histopatológicas. Os tecidos possivelmente infectados, destinados à aplicação destes marcadores (coração e hepatopâncreas), foram inicialmente submetidos a um método de extração de DNA baseado na alta resistência da parede celular das leveduras (com elevadas concentrações de quitina), possibilitando assim a separação do DNA do fungo e o DNA de *U. cordatus*.

Extração do DNA - tecidos infectados. Esta extração de DNA ocorreu em duas etapas; a primeira objetivou a retirada do DNA do caranguejo-uçá. O tecido de interesse foi transferido para um microtubo (eppendorf 1,5 mL) onde foram adicionados 480 µL de tampão de digestão (Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM e SDS 0,5%) e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) para digestão do tecido. A solução foi incubada por 3 horas a 50°C. A remoção total do DNA do caranguejo foi realizada através da solubilização de 500 µL com o kit EZ-DNA (Biosystems, Brasil). Essa solução foi incubada por mais 30 minutos a 50°C. Nesse momento do protocolo, o DNA do hospedeiro encontra-se em solução, enquanto que o DNA do agente patogênico permanece nas células leveduriformes. Cada amostra foi centrifugada a 1232 g (Centrífuga Eppendorf 5415R) por 5 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA de *U. cordatus*, foi desprezado. O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de água ultrapura, novamente centrifugado e o sobrenadante desprezado. Esse processo foi repetido 3 vezes para permitir a separação eficiente das células leveduriformes do DNA do caranguejo. A segunda etapa da extração iniciou com o rompimento do revestimento da célula do fungo, o qual se deu por meio da trituração em nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo. Em seguida, a extração do DNA do fungo prosseguiu-se como descrito na primeira etapa, com alguns passos adicionais: o precipitado foi centrifugado com álcool etílico absoluto e 96% (Merck), e em seguida eluído com NaOH (Adaptado de BOEGER *et al.*, 2005).

Aplicação dos marcadores específicos. O DNA extraído dessas amostras, foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de um fragmento específico do DNAr inserido na região ITS. Os iniciadores SalmF5 (5' CCC TCT GGC CCG CGC TCG TCG ACA GC 3') e SalmR3 (5' GAG AAA GAT TCT

CCC TGA GGG GAG GCA G 3') foram especialmente projetados para apresentar uma extensa detectabilidade e especificidade (PIE *et al.*, dados não publicados). As reações de amplificação (25 µL) foram preparadas com 10-60 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 400 µM de solução de dNTPs, 1x de solução tampão, 1,25 U de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen), 2 pmoles de cada iniciador. As condições das reações otimizadas foram as seguintes: ativação da enzima por 5 minutos a 94°C, e 25 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 40 segundos a 75,5°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C. A reação foi encerrada com uma extensão final de 2 minutos a 72°C.

Alíquotas de 2 µL dos produtos de amplificação por PCR foram utilizadas para a avaliação da reação através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (ANEXO, item 4), seguida de coloração por brometo de etídio. A identificação de cada amostra processada foi considerada positiva quando a aplicação do marcador resultou em uma banda de tamanho idêntico ao tamanho do extrato controle do fungo da DCL (aproximadamente 450 pares de base).

2.2.2.4 Análises microbiológicas

O re-isolamento de fungos recuperados a partir de tecidos (coração, gânglio torácico, hemolinfa e hepatopâncreas) de animais mortos durante o experimento, foi realizado através do cultivo em meio Mycosel durante 2 semanas a 28°C, visando detectar a presença de leveduras negras com colônias apresentando características morfológicas (conidiogênese) diagnósticas do fungo isolado de caranguejos portadores da DCL. Amostras desses isolamentos foram ainda submetidas a PCR com marcador molecular específico para confirmação da identidade do agente etiológico.

Extração do DNA - micélio da colônia. Após 2 semanas de cultivo em Ágar Sabouraud Dextrosado sólido (incubados a 28°C), foram coletados aproximadamente 1 cm² de micélio, transferindo-se para um microtubo (eppendorf 1,5mL) contendo 300 µL de tampão CTAB (ANEXO, item 9) e uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck / celite 2:1). O material foi triturado com o auxílio de pistilo durante 1 a 2 minutos. Após a trituração acrescentou-se 200 µL de tampão CTAB, agitando e incubando por 10 minutos a 65°C. Posteriormente foi adicionado 500 µL de clorofórmio, provocando o surgimento de fases na solução resultante, as quais

foram misturadas cuidadosamente. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 2414,72 g durante 5 minutos (este procedimento foi repetido quando necessário). A fase aquosa foi coletada e dois volumes de etanol 96% (Merck) gelado foram acrescentados, assim, a precipitação do DNA foi realizada a -20°C por 30 minutos ou tempo necessário. Após esta fase da extração, procedeu-se a centrifugação a 2414,72 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado, submetido à centrifugação por 1 minuto e os tubos vertidos até a secagem completa do precipitado a temperatura ambiente. Por fim, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE (ANEXO, item 10), e incubado por 2 horas a temperatura ambiente (VICENTE, 2000).

Posteriormente, estas amostras de DNA extraídos das colônias foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos no item 2.2.2.3 (“Identificação molecular”).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Taxa de mortalidade nas infecções experimentais

Os padrões de mortalidade exibidos pelos bioensaios de infecção experimental, tanto contínua como não-contínua, foram consistentes com uma elevada virulência do fungo estudado.

Bioensaio de infecção não-contínua. A mortalidade dos animais inoculados iniciou 11 dias após a infecção, onde 20% dos animais injetados com a solução inóculo morreram (n=2). Este fenômeno acentuou-se em torno de 29 dias de experimento, representando uma mortalidade acumulada de 50% dos animais. Ao final de 30 dias, 60% (n=6) dos animais inoculados com *Exophiala* sp. encontravam-se mortos. Por outro lado, o grupo controle submetido apenas ao estresse da agulha de injeção apresentou mortalidade nula ao final do experimento, enquanto que apenas uma morte foi registrada no grupo inoculado com solução salina (FIGURA 16).

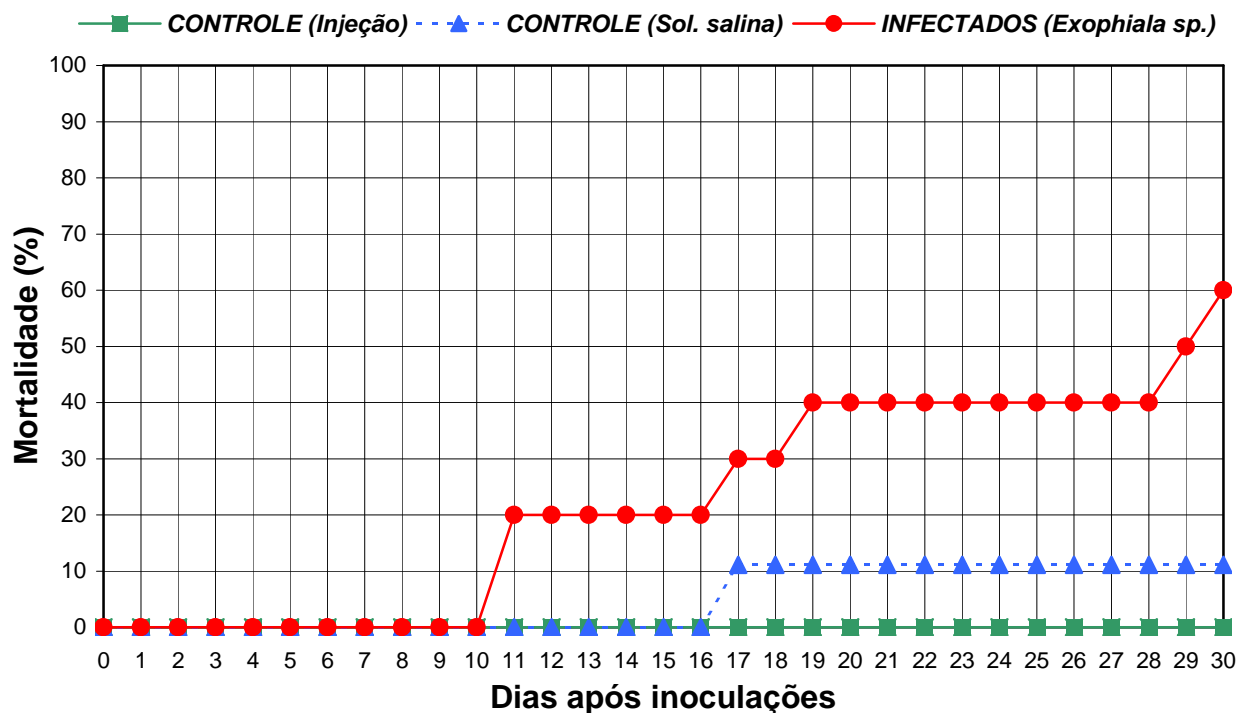


FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA MORTALIDADE DE CARANGUEJOS-UÇÁ AO LONGO DO BIOENSAIO DE INFECÇÃO NÃO-CONTÍNUA
 FONTE: O autor (2008)

Bioensaio de infecção contínua. As mortalidades dos *U. cordatus* pertencentes ao tratamento inoculado com *Exophiala* sp. iniciaram-se no 9º dia. Com 17 dias de experimento, após a segunda injeção da solução inóculo (14º dia), este fenômeno atingiu 50% (n=5) dos animais. Esta taxa não sofreu alterações após a terceira inoculação de *Exophiala* sp. (20º dia), sendo assim, no final dos 30 dias de experimento 50% dos animais deste tratamento haviam sobrevivido. Contudo, ambos grupos utilizados como controle, tanto o submetido ao estresse da agulha de injeção quanto o inoculado com solução salina, não apresentaram mortalidades (FIGURA 17).

Durante o processo de verificação do grau de higidez dos animais infeccionados experimentalmente, alguns espécimes apresentaram sinais clínicos semelhantes aos observados nos *U. cordatus* acometidos com DCL. Ou seja, momentos antes da sua morte, alguns caranguejos do experimento demonstraram-se letárgicos, atáxicos, havendo até mesmo, episódios de tetania.

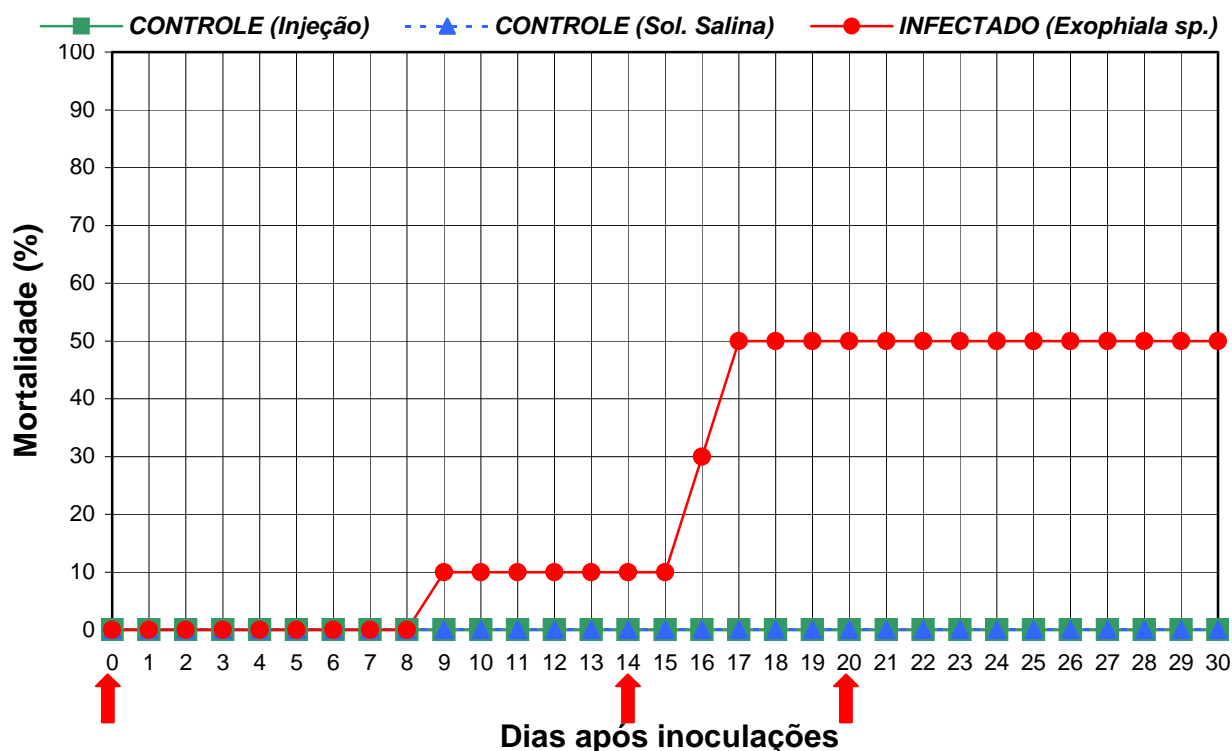


FIGURA 17- CURVAS DE MORTALIDADE DOS *U. cordatus* SUBMETIDOS AO BIOENSAIO DE INFECÇÃO-CONTÍNUA. OS DIAS DE INOCULAÇÃO ESTÃO INDICADOS PELAS SETAS VERMELHAS

FONTE: O autor (2008)

2.3.2 Histopatologia

Embora hifas (somáticas e conidióforos) e células leveduriformes encontraram-se extensamente presentes no corpo dos caranguejos artificialmente infectados, o grau dos danos histopatológicos causados pelas formas do fungo variaram de acordo com os órgãos e tecidos afetados, como caracterizado a seguir.

Brânquias. Apresentaram, no padrão histológico normal, podócitos (células associadas à excreção), artérias, vasos eferentes e aferentes, epitélio e tecido conjuntivo esponjoso em sua haste central. As lamelas são constituídas por epitélio, arteríolas, seios hemais, células pilares e canal marginal. Todas estas estruturas branquiais de *U. cordatus* são revestidas por uma camada de cutícula que está em constante contato com a água (FIGURAS 18A,B).

Os *U. cordatus* mortos após injeção artrodial da solução inóculo apresentaram nas brânquias a formação de aglutinações hemocíticas (granulomas), situadas principalmente nas artérias hipobranquiais, seios hemais e vasos aferentes das

lamelas branquiais. Muitas destas respostas imunes celulares exibem elementos fúngicos (hifas moniliformes ou distorcidas e células leveduriformes) encapsulados, ocorrendo em muitos casos deposição de mielina nestas formações (FIGURAS 19A,B).

Coração. É composto por três tecidos: pericárdio (tecido conjuntivo denso), epicárdio (tecido conjuntivo frouxo) e miocárdio (tecido muscular), este constituído por fibras cardíacas (FIGURA 18C).

A presença de células leveduriformes e hifas foi muito conspícua no coração dos caranguejos infectados artificialmente, sendo este extensivamente danificado por estas formas fúngicas. Neste órgão, as infecções limitaram-se ao miocárdio, não havendo registros de elementos fúngicos nos tecidos pericárdicos e epicárdicos, mesmo nos animais que apresentaram fortes sinais clínicos de DCL (ataxia) antes de sua morte. Foram detectados, além de hifas catenuladas (moniliformes ou distorcidas; coradas em marrom), dois morfotipos leveduriformes, alguns de dimensões maiores, que coram positivamente para PAS, ligeiramente avermelhados; e outros muito reduzidos, corados em azul, exclusivamente presentes no bioensaio de infecção contínua. Estes últimos apresentavam-se abundantemente nos tecidos mais gravemente deteriorados, com fortes sinais de necrose tecidual. Infiltrações hemocíticas e granulomas (alguns melanizados; englobando especialmente hifas) foram as respostas imunes mais comumente observadas no hospedeiro. Estas extensas infiltrações dentro das fibras musculares cardíacas sugerem forte resposta inflamatória a presença dos elementos fúngicos e/ou para reparar os danos teciduais do *U. cordatus*. Da mesma forma que as histopatologias apresentadas no coração, como desorganização miocárdica e extensas necroses, insinuam uma redução na função cardíaca (FIGURAS 19C,D,E).

Gânglio torácico. Formado por células neurogliais, neurosecretoras e gliais, estas últimas envolvendo, suportando, separando e nutrindo o gânglio e os outros grupos celulares. Todos estes grupos e os feixes nervosos são internalizados em uma membrana fibrosa denominada neurilema. A circulação no complexo ganglionar é feita por vasos hemais, arteríolas ou, até mesmo, fissuras nos tecidos (FIGURA 18D).

Seções histológicas do complexo ganglionar de caranguejos mortos nos bioensaios de infecção revelaram infiltrações hemocíticas aparentemente associadas às infecções fúngicas. Grande concentração de granulomas, contendo

hifas e células leveduriformes, foi constatada externamente ao neurilema, membrana que provavelmente serve de barreira contra estas infecções. Animais experimentais que antes de sua morte exibiram comportamento atáxico e tetania, apresentaram encapsulações hemocíticas (cercando células leveduriformes e/ou hifas) comprimindo claramente suas fibras nervosas. Sinais de degeneração tecidual foram detectados próximos a alguns nódulos (FIGURAS 19F,G).

Hepatopâncreas. Formado por centenas de túbulos cegos que estão conectados ao trato digestório (estômago pilórico). Estes túbulos são constituídos por quatro tipos celulares: as células embrionárias (“E-Cells”), que originam as demais; as células fibrosas (“F-Cells”); as células de reserva e absorção (“R-Cells”); e as células de excreção (“B-Cells”), responsáveis pela produção de enzimas digestivas. Entre os túbulos ou cecos existem células fagocitárias fixas e hemócitos (FIGURAS 18E,F).

Nenhuma forma fúngica foi observada no lúmen dos túbulos coletados de espécimes de *U. cordatus* submetidos ao tratamento de infecção artificial. Contudo, vários nódulos mostraram-se presentes ao redor das células que compõem estes túbulos. Assim, como constatado nos outros tecidos analisados, as respostas inflamatórias foram representadas por intensas infiltrações e aglutinações hemocíticas ao redor das células fúngicas. Portanto, os elementos fúngicos podem ser responsáveis por danos dos processos de absorção e digestão. (FIGURA 19H)

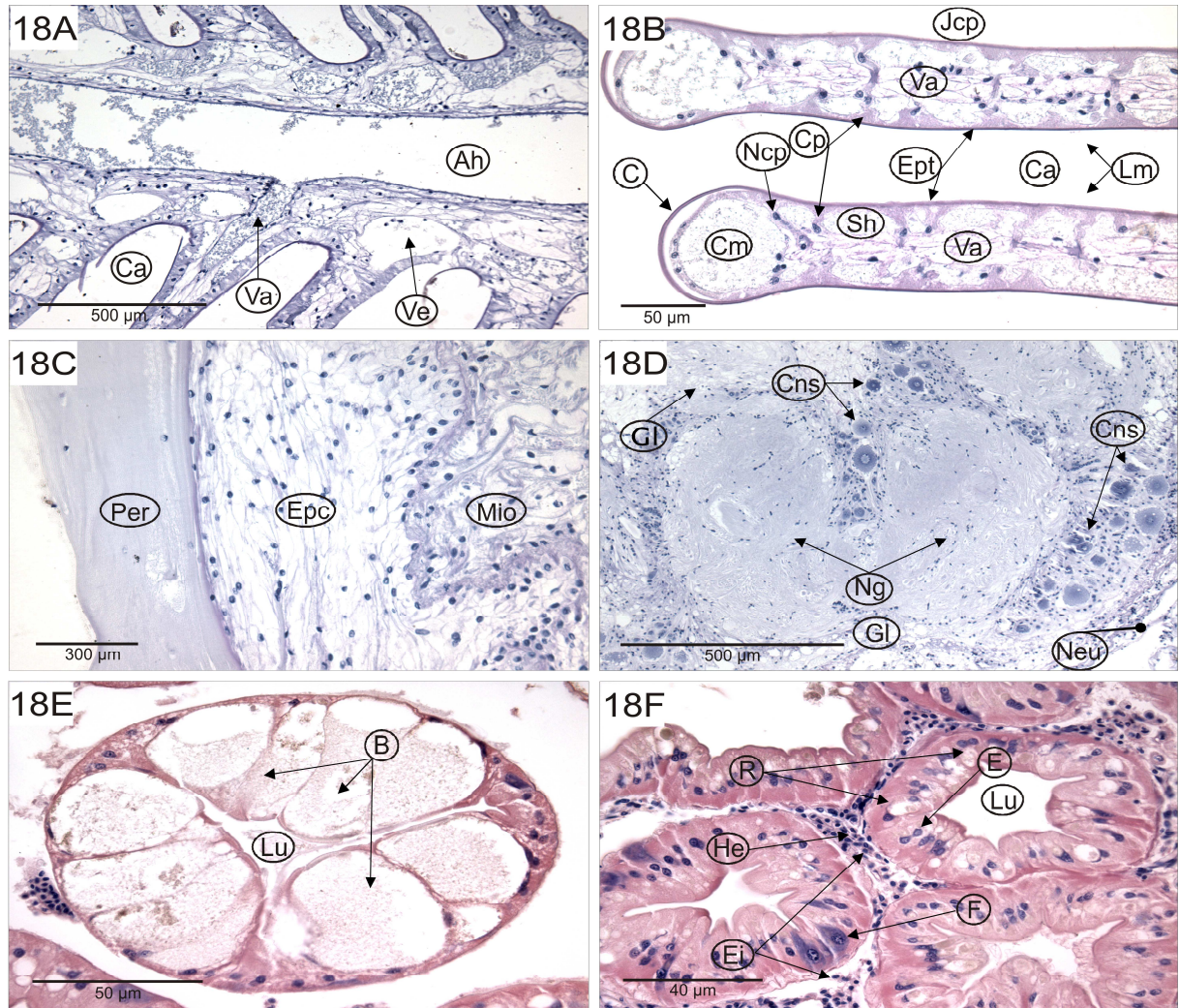


FIGURA 18 (A-F)- HISTOLOGIA DE ESPÉCIMES SADIOS DE *Ucides cordatus*. (A). (COLORAÇÃO PAS) SEÇÃO TRANSVERSAL DA BASE DE UMA BRÂNQUIA. ARTÉRIA HIPOBRANQUIAL (AH), CANAL DE ÁGUA (CA), VASO AFERENTE (VA) E VASO EFERENTE (VE). **(B).**(PAS). PORÇÃO DISTAL DE UMA LAMELA (LM). CUTÍCULA (C), CANAL DE ÁGUA (CA), CANAL MARGINAL (CM), CÉLULAS PILARES (CP), EPITÉLIO (EPT), JUNÇÃO DE DUAS CÉLULAS PILARES (JCP), NÚCLEOS DAS CÉLULAS PILARES (NCP), SEIOS HEMAIS (SH) E VASO AFERENTE (VA). **(C).**(PAS). TECIDO MIOCARDIAL (MIO) ENVOLVIDO POR TECIDOS CONJUNTIVOS, O EPICÁRDIO (EPI) E O PERICÁRDIO (PER). **(D).**(PAS) CORTE TRANSVERSAL DO GÂNGLIO TORÁCICO. NEUROGLIA (NG), CÉLULAS NEUROSECRETORAS (CNS), CÉLULAS GLIAIS (GL) E NEURILEMA (NEU). **(E).**(H&E). CORTE TRANSVERSAL DA PORÇÃO MAIS APICAL DOS CECOS. LÚMEN (LU), ESPAÇO INTERSTICIAL (EI), HEMÓCITOS (HE), CÉLULAS EMBRIONÁRIAS (E), CÉLULAS DE RESERVA (R) E CÉLULAS FIBROSAS (F). **(F).**(PAS). CORTE TRANSVERSAL DA PORÇÃO MAIS BASAL DO CECO. CÉLULAS PRODUTORAS DE ENZIMAS (B) E LÚMEN (LU)

FONTE: O autor (2008)

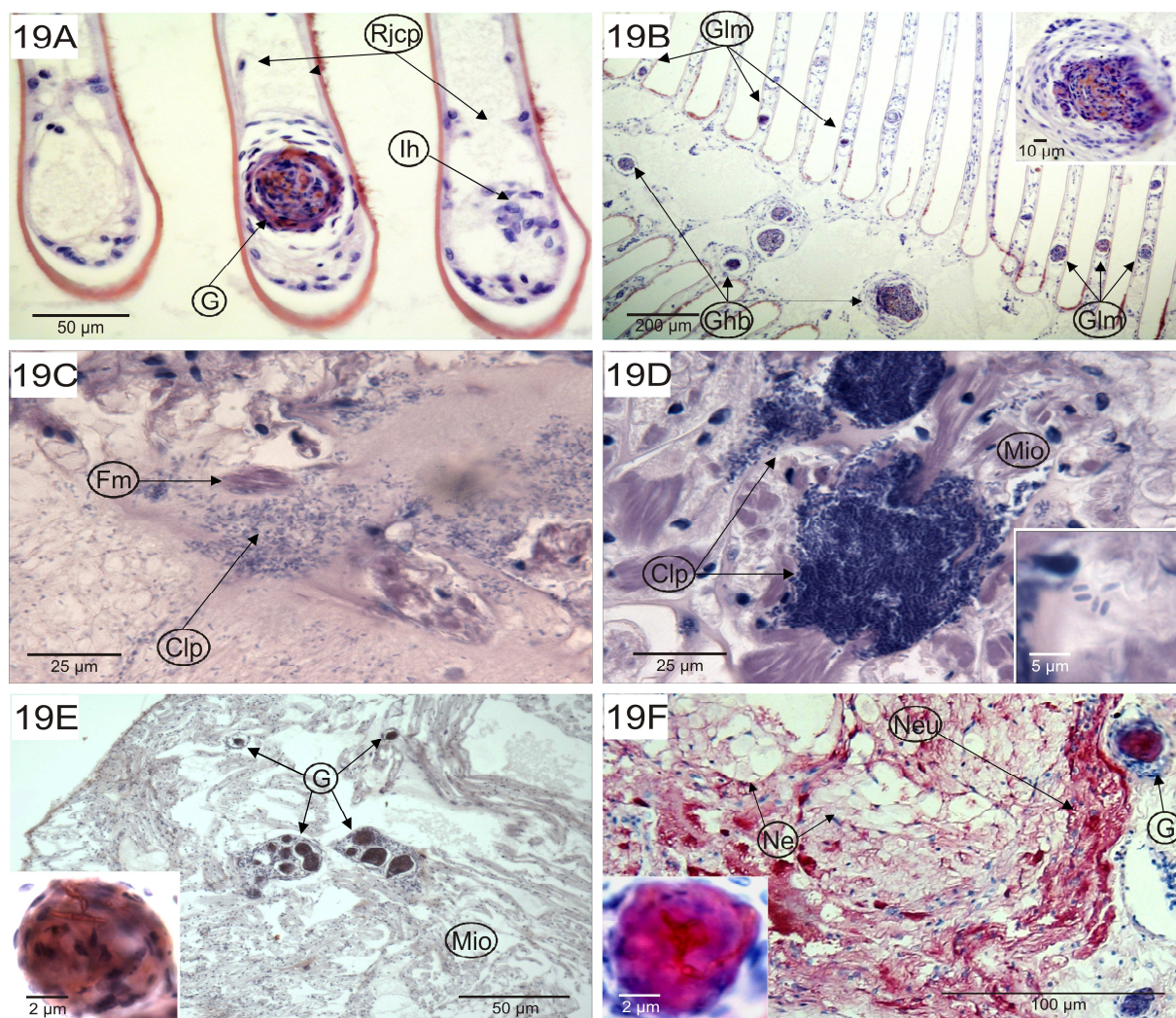


FIGURA 19 (A-F)- HISTOPATOLOGIA DE ESPÉCIMES DE *Ucides cordatus* INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Exophiala* sp. (A).(PAS). SEÇÃO TRANSVERSAL DO ÁPICE DAS LAMELAS BRANQUIAIS. INFILTRAÇÃO HEMOCÍTICA (IH), GRANULOMA (G) E RUPTURA DA JUNÇÃO DAS CÉLULAS PILARES (RJCP). (B).(PAS). SEÇÃO TRANSVERSAL DA ARTÉRIA HIPOBRANQUIAL E LAMELAS. GRANULOMAS NA ARTÉRIA HIPOBRANQUIAL (GHB) E GRANULOMAS NAS LAMELAS (GLM). (C).(PAS). CORTE DO TECIDO CARDÍACO. FORTE INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES PEQUENAS (CLP) PROVOCANDO RUPTURA DE FIBRAS MUSCULARES (FM) E DESORGANIZAÇÃO DO TECIDO. (D).(PAS). CORTE DO TECIDO MIOCARDÍACO (MIO). CÉLULAS LEVEDURIFORMES PEQUENAS INFILTRANDO OS ESPAÇOS INTERSTICIAIS, PADRÃO EXISTENTE APENAS NOS TECIDOS DE CARANGUEJOS DO BIOENSAIO DE INFECÇÃO CONTÍNUA. (E).(PAS). CORTE DO TECIDO CARDÍACO, ONDE SE OBSERVA O MIOCÁRDIO (MIO) E O EPICÁRDIO (EPC). GRANULOMAS DISTRIBUÍDOS PELO MIOCÁRDIO, DESTACANDO-SE A GRANDE QUANTIDADE DE HIFAS MONILIFORMES, DISTORCIDAS E CÉLULAS LEVEDURIFORMES EM SEU INTERIOR. (F).(PAS) CORTE DO GÂNGLIO TORÁCICO. OBSERVA-SE UM GRANULOMA CONTENDO GRANDE QUANTIDADE DE CÉLULAS FÚNGICAS (CORADAS EM MARROM) (G) EXTERNAMENTE AO NEURILEMA (NEU), CERCADO POR CÉLULAS GLIAIS (GL)

FONTE: O autor (2008)

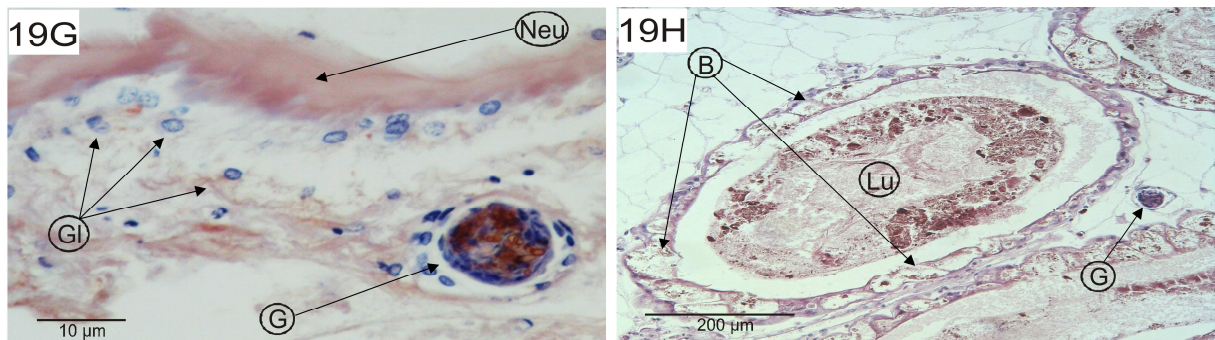


FIGURA 19 (G-F)- (G).(PAS). SEÇÃO TRANSVERSAL DO GÂNGLIO TORÁCICO. GRANULOMA (G) MIELINIZADO CONTENDO HIFAS CATENULADAS PRESSIONANDO FEIXES DE NERVOS (NE) REVESTIDOS PELO NEURILEMA (NEU). (H).(PAS). CORTE TRANSVERSAL DA PORÇÃO MAIS BASAL DE CECOS DO HEPATOPÂNCREAS. GRANULOMA PRESENTE NO ESPAÇO INTERSTICIAL, EXTERNAMENTE AO CECO COMPOSTO POR CÉLULAS PRODUTORAS DE ENZIMAS (B) E LÚMEN (LU)

FONTE: O autor (2008)

2.3.3 Identificação molecular

A aplicação do marcador molecular específico para *Exophiala* sp. resultou na confirmação da identidade dos fungos encontrados nos tecidos dos caranguejos-uçá artificialmente infectados e que morreram durante o experimento. Ou seja, o fungo presente nas amostras destes animais, que em alguns casos morreram após exibirem sintomas de DCL, pertence à linhagem de *Exophiala* originalmente isolada de animais enfermos e cultivada em laboratório (FIGURA 20). Dentre os tecidos submetidos a esta metodologia, verificou-se um maior grau de pureza do DNA fúngico extraído das amostras de coração.

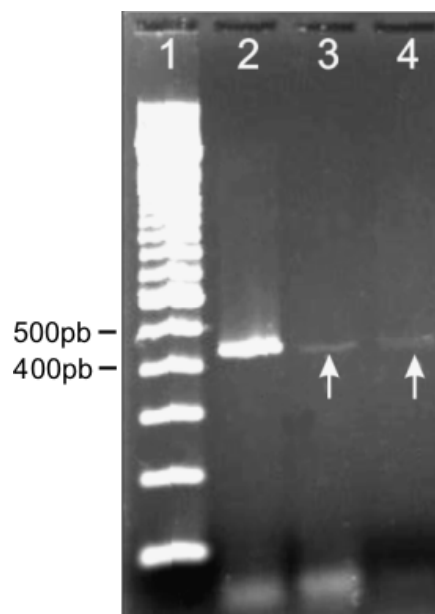


FIGURA 20- GEL DE AGAROSE COM O RESULTADO DA APLICAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR ESPECÍFICO EM EXTRATOS DE CORAÇÃO DE *Ucides cordatus* ARTIFICIALMENTE INFECTADOS COM *Exophiala* sp. **COLUNA 1.** MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PB). **COLUNA 2.** CONTROLE POSITIVO - *Exophiala* sp. DO CULTIVO ISOLADO DE ANIMAIS ENFERMOS OBTIDOS DURANTE EVENTOS DE MORTANDADE. **COLUNAS 3 E 4.** EXTRATO DE CORAÇÃO DE CARANGUEJOS ORIGINALMENTE SADIOS QUE APÓS INFECTADOS MORRERAM DURANTE A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO. SETAS BRANCAS RESSALTAM A LOCALIZAÇÃO DAS BANDAS
FONTE: O autor (2008)

2.3.4 Análise microbiológica

Em aproximadamente duas semanas após o esfregaço em meio Mycosel dos tecidos coletados de caranguejos que morreram durante o experimento, foram observadas colônias leveduriformes com características semelhantes às isoladas de *U. cordatus* com DCL; marrons e aveludadas no centro, negras e lisas próximas à margem (FIGURA 21A,B,C). A aplicação do marcador molecular específico nos extratos de DNA destas culturas re-isoladas (FIGURA 21D) demonstrou, com absoluta segurança, que estes fungos representam de fato às linhagens originalmente associadas a Doença do Caranguejo Letárgico.

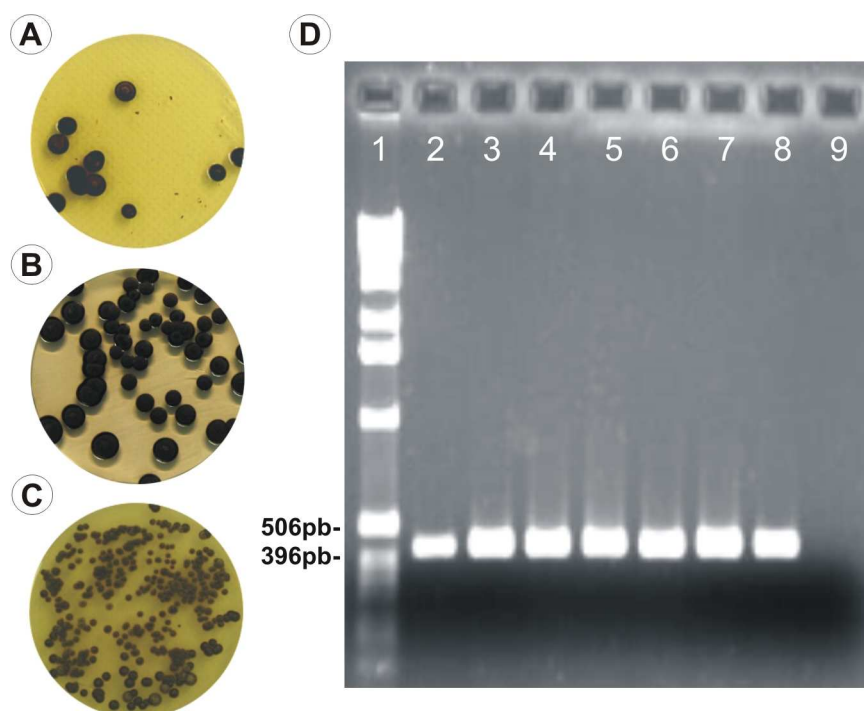


FIGURA 21 (A-D)- COLÔNIAS LEVEDURIFORMES RE-ISOLADAS DE GÂNGLIO TORÁCICO (A), CORAÇÃO (B) E HEPATOPÂNCREAS (C) DE *Ucides cordatus* ARTIFICIALMENTE INFECTADOS COM *Exophiala* sp. E GEL DE AGAROSE (D) EXIBINDO O RESULTADO DA APLICAÇÃO DOS MARCADORES ESPECÍFICOS NOS EXTRATOS DE DNA DESTAS COLÔNIAS. **COLUNA 1.** MARCADOR DE PESO MOLECULAR (1KPB). **COLUNA 2.** CONTROLE POSITIVO - *Exophiala* sp. DO CULTIVO ISOLADO DE ANIMAIS ENFERMOS OBTIDOS DURANTE EVENTOS DE MORTANDADE. **COLUNAS 3, 4, 5, 6, 7 E 8.** APLICAÇÃO DOS INICIADORES EM AMOSTRAS DE COLÔNIAS RE-ISOLADAS DO CORAÇÃO (3 E 4), HEPATOPÂNCREAS (5 E 6) E GÂNGLIO TORÁCICO (7 E 8) DE ANIMAIS INOCULADOS COM *Exophiala* sp. **COLUNA 9.** CONTROLE NEGATIVO

FONTE: O autor (2008)

2.4 DISCUSSÃO

As leveduras negras (fungos dematiáceos) são conhecidos agentes etiológicos de uma variedade de infecções sistêmicas e/ou localizadas, em humanos e outros vertebrados (micetomas eumicóticos, feohifomicose e cromoblastomicose) (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1982; HOOG, 1997; HOOG *et al.*, 1998). No entanto, o presente estudo demonstra fortes evidências, por meio do cumprimento dos rigorosos postulados de Koch, de que a Doença do Caranguejo Letárgico (DCL) representa um dos primeiros registros de feohifomicose sistêmica em invertebrados, tendo como agente etiológico *Exophiala* sp. Esses resultados corroboram a hipótese de Boeger *et al.* (2005, 2007) sobre a origem etiológica desta enfermidade,

responsável por eventos de mortandade do caranguejo *Ucides cordatus* em diversas localidades da região nordeste brasileira.

Recentemente, Dover *et al.* (2007) relataram eventos epizoóticos emergentes em mexilhões (*Bathymodiolus brevior*) da Bacia Fiji (Nova Zelândia), também identificando como agente causal o fungo dematiáceo *Capronia* sp., forma teleomórfica do gênero *Exophiala* (MULLER *et al.*, 1987). Nos exames histológicos, Dover *et al.* (2007) detectaram a presença de densas populações de células leveduriformes e pequenas hifas de parede espessa em manchas marrons no tecido do manto (ou pálio). Nestes animais, os tecidos conectivos ao redor das gônadas e túbulos do hepatopâncreas também estavam infectados com elementos fúngicos e infiltrados por hemócitos. Outros espécimes de mexilhões com o corpo negro, além de células leveduriformes abundantes no tecido conectivo associado ao manto e a massa visceral, apresentavam nos filamentos branquiais notáveis corpos escuros que correspondiam a agregações densas de material fúngico. Outra importante observação histopatológica constatada nestes indivíduos foi atrofia gonadal em presença dos elementos fúngicos, além da presença relativamente rara destes elementos em tecidos musculares (coração), exceto em infecções mais severas. Boeger *et al.* (2005) em suas investigações preliminares a respeito do agente etiológico da DCL, também relataram em *U. cordatus* coletados em estados avançados da enfermidade, elevada abundância de células fúngicas livres ou em nódulos (aglutinações hemocíticas) no coração, lamelas branquiais, gânglio torácico e cercando os túbulos do hepatopâncreas. Contudo, não foram observadas alterações gonadais nos caranguejos acometidos com DCL como já indicado por Boeger *et al.* (2007).

No presente estudo, as análises microscópicas de secções teciduais de *U. cordatus* infectados artificialmente, exibiram um padrão de infiltrações hemocíticas e profusão de células leveduriformes e/ou hifas (somáticas e conidióforos) encapsuladas por hemócitos - formando granulomas (nódulos) freqüentemente com deposição de melanina. Além disso, nos bioensaios de infecção contínua, ampla quantidade de células fúngicas livres, de morfotipo reduzido, foram observadas ocupando vasos, seios hemais e espaços intersticiais dos animais experimentais; com exceção das brânquias, onde foram raras observações destes elementos fúngicos (livres ou em nódulos). Tais padrões foram corroborados na histopatologia de caranguejos-uçá moribundos durante eventos de DCL, descrita detalhadamente

por Boeger *et al.* (2007) salvo alguns contrapontos. Nestes animais, as células leveduriformes disseminadas livremente exibem um morfotipo maior do que as observadas nos tecidos de *U. cordatus* infectados artificialmente. Outra dissimilaridade está na presença de hifas livres frouxas envolvendo os tecidos (principalmente cardíacos) dos animais enfermos nos manguezais. Tais elementos são observados somente em caranguejos extremamente debilitados. Segundo Oujezdsky *et al.* (1973), isso deve-se ao fato de células fúngicas em ambientes estáveis encontrarem-se na fase estacionária, ou seja, acumulando lipídios que promoverão a conversão para hifas. Estes fatores sugerem que os animais infectados artificialmente não desenvolveram um estado avançado de fragilidade imune, pois provavelmente em função do contínuo estresse da clausura experimental, morreram previamente.

Investigações histopatológicas envolvendo modelos vertebrados (camundongos e peixes sadios) infeccionados artificialmente por fungos dematiáceos e posteriormente sacrificados (em média após duas semanas) (IWATSU, *et al.*, 1981; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1982; OHORI, *et al.*, 2005), apresentaram padrões semelhantes de reposta imune aos apresentados neste estudo por *U. cordatus*. Ou seja, apesar do sistema imune dos vertebrados incluir memória adaptativa, imunoglobulinas que reconhecem epítomos específicos e células especializadas (linfócitos, por exemplo), as respostas não específicas por meio de fagócitos e células gigantes são análogas às utilizadas pelos hemócitos dos crustáceos. Assim, ambos grupos inicialmente reconhecem os elementos não-próprios ao organismo, fagocitando-os ou promovendo infiltrações hemocíticas com a finalidade de englobá-los para posterior eliminação (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992). Similaridades também estão presentes nas formas de elementos fúngicos encontrados nos tecidos infectados (células leveduriformes, hifas moniliformes ou distorcidas). Outra característica notável a estes bioensaios refere-se à afinidade destes elementos ao sistema nervoso, podendo ser facilitada pelos elevados índices de ferro livre neste sistema (HOOG, 1993). Estas disseminações neurotrópicas justificam a letargia presente na maioria dos animais modelos, assim como os registros de tetania tanto nos caranguejos-uçá infeccionados naturalmente como nos artificialmente.

Com eficácia, o modelo experimental de infecções adotado neste estudo permitiu a reprodução artificial dos sinais clínicos e danos histopatológicos

observados em *U. cordatus* coletados em eventos de mortandade. Nestas circunstâncias, o animal torna-se cada vez mais letárgico e atáxico à medida em que a doença desenvolve-se, o que resulta na redução de destreza para alimentar-se e escapar de predadores ou catadores. Além disso, catadores relatam tetania em alguns caranguejos durante eventos de DCL. Estes sinais sugerem intensos danos do gânglio torácico, como as compressões de feixes nervosos por nódulos evidenciadas neste estudo. A rápida morte dos caranguejos-uçá nos manguezais, associada com sua captura e transporte, parece estar correlacionada com sua inabilidade de responder adequadamente a estes estresses. Da mesma forma, os animais experimentais submetidos ao constante estresse do cativeiro, provavelmente são incapacitados de suplementarem oxigênio a níveis requeridos por seu organismo, em virtude da obstrução de seios e veias hemais por nódulos, provocando assim, extensos danos teciduais.

Outro importante fator, não reproduzido no presente estudo, possivelmente em função da via de infecção utilizada (inoculação artrodial), é a deterioração observada nas lamelas branquiais de caranguejos em estado avançado da DCL (BOEGER *et al.*, 2007). A devastação das células pilares e epiteliais neste órgão, aparenta estar associada à abrasão imposta pela fluidez da hemolinfa, carregando grandes quantidades de células leveduriformes.

Por fim, a morte de *U. cordatus* por DCL (de etiologia natural ou experimental) provavelmente ocorra por uma combinação de fatores, como falha cardíaca, inanição e asfixia, conseqüências de injúrias causadas por *Exophiala* sp. nas brânquias, coração, hepatopâncreas e gânglio torácico. Além disso, o estresse nos animais experimentais representa um fator preponderante neste desfecho.

Os fungos dematiáceos, em função de suas células melanizadas, são capazes de viver em condições extremas, tais como altas temperaturas e exposição à radiação ultra-violeta (WHELLER e BELL, 1988), além de produzir caroteno quando incubados na presença de luz (GEIS e SZANISZO, 1984). Sendo assim, a presença de pigmentos nesses agentes pode neutralizar radicais livres e consequentemente favorecer uma resistência à ação da fagocitose em tecidos de hospedeiros (DIXON e POLAK-WYSS, 1991). Feng *et al.* (2001) utilizando sistemas de inoculação de linhagens de *Exophiala dermatitidis* (Kano) Hoog (filogeneticamente próxima ao agente causador da DCL) em camundongos imunocompetentes, comprovou a importância da melanina na virulência destas

linhagens, em função das altas taxas de mortalidade obtidas por inoculação de linhagens selvagens (de 80% a 100%) em comparação a mutantes albinas (0 a 10%). Hoog (1993) levantou a hipótese, em função da aparente facilidade com a qual estes fungos causam infecções, que estas espécies podem compartilhar outros fatores necessários para o crescimento e dispersão em seus nichos naturais, os quais também facilitariam sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Portanto, pode-se inferir no presente estudo que a não exposição da linhagem laboratorial de *Exophiala* sp. a condições desfavoráveis, como ausência de nutrientes facilmente degradáveis, diferentes temperaturas e estresse osmótico, possivelmente influenciou as taxas de mortalidade observadas nos experimentos. Ou seja, a situação estável a que estas linhagens encontravam-se provavelmente não as induziu a adaptações de sobrevivência (conseqüentemente, virulência para o hospedeiro).

Espinell-Ingroff *et al.* (1988) com o intuito de diferenciar alguns fungos dematiáceos patogênicos de sapróbios, utilizaram 26 formulações de gelatina, leite, caseína e meio Loeffler para avaliar a atividade proteolítica. A maioria destes organismos (incluindo *Exophiala* spp.) não apresentou nenhuma atividade proteolítica. No presente trabalho a integridade de determinados tecidos com abundância de colágeno (tecido pericárdico) aponta para uma possível ausência de proteases no agente etiológico da DCL. Silva *et al.* (2005) estudando fatores de virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, relatam que a eficiente disseminação destes organismos no hospedeiro deve-se a sua habilidade em induzir apoptose ou morte programada de fagócitos. Portanto, outros fungos patogênicos, como as leveduras negras isoladas de *U. cordatus*, podem explorar este mecanismo para subverter as defesas do hospedeiro e permitir a sua infecção, o que explicaria alguns quadros de necrose tecidual observados nos caranguejos-uçá naturalmente e artificialmente infectados.

A aplicação de técnicas moleculares nas amostras teciduais e nas culturas isoladas dos caranguejos sadios infectados experimentalmente confirmou a utilidade da região ITS no desenvolvimento de marcadores específicos para identificação de fungos patogênicos. Além disso, demonstrou-se tratar de uma técnica mais rápida e precisa do que os métodos de identificação morfológica e fisiológica, resolvendo as intrincadas questões acarretadas pelo ciclo de vida anamórfico das espécies de *Exophiala*, com ocorrência de vários tipos de micélios e sinanamorfias (HOOG *et al.*, 1994).

As espécies que constituem *Exophiala* são ubíquas, e têm sido isoladas do solo, águas poluídas, pedaços de madeira e folhas em decomposição (HOOG e GUARRO, 1995). Nieves-Rivera (2005) isolou uma linhagem deste gênero em folhas de *Rhizophora mangle* de manguezais em Porto Rico. Segundo Nordhaus (2003), 61,2% da dieta de *U. cordatus* baseia-se em folhas de mangue, além disso, experimentos que investigavam a seletividade de alimento realizada por esta espécie, revelaram uma preferência por folhas amareladas de *R. mangle*. Ainda, segundo essa autora, caranguejos são freqüentemente observados alimentando-se de algas, organismos que apresentaram uma taxa C:N (medida do valor nutricional da dieta) mais favorável, o que sugere que algas verdes e marrons também são um componente importante da alimentação, compensando a desfavorável taxa C:N das folhas de mangue. Logo, pode-se conjecturar que uma importante fase do ciclo de vida do fungo associado a DCL ocorre em vegetais na fase de decomposição, reforçando a importância de estudos direcionados ao isolamento ambiental deste patógeno. Além disso, bioensaios de vias de infecção serão essenciais para elucidar o cenário epidemiológico desta enfermidade. Ambos estudos exemplificam mais uma prática aplicação dos marcadores moleculares específicos, que possibilitarão uma rápida e precisa diagnose de *Exophiala* sp. em suas respectivas amostras (ambientais e teciduais).

Por fim, apesar do estudo ter corroborado a patogenicidade de *Exophiala* sp. ao caranguejo *U. cordatus*, limitações metodológicas dos bioensaios requerirão novas avaliações. Ou seja, as injeções artrodiais adotadas neste modelo experimental, apesar de possibilitarem a quantificação do patógeno inoculado, ultrapassaram a primeira linha de defesa do hospedeiro (cutícula). Em vista disso, estudos posteriores serão necessários para elucidar a interação deste fungo dematiáceo com o corpo de seus hospedeiros durante infecções por vias alternativas (água e alimentos), possibilitando uma compreensão da dinâmica de infecção e transmissão do fungo. Além disso, pesquisas direcionadas a tolerância do patógeno a diversas salinidades, poderão elucidar rotas de dispersão do mesmo no ambiente.

REFERÊNCIAS

ABLIZ P.; FUKUSHIMA K.; TAKIZAWA K.; NISHIMURA, K. Specific Oligonucleotide Primers for Identification of *Cladophialophora carrionii*, a Causative Agent of Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 404–407, 2004.

ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Specific oligonucleotide primers for identification of *Hortaea werneckii*, acausative agent of tinea nigra. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 46, p. 89–93, 2003.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**, Vol. 1 e 2. Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A., 574 p., 1976.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 161-167, 2005.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; VICENTE, V. A.; OSTRENSKY, A.; HUNGRIA, D.; CASTILHO, G. G. Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 73-81, 2007.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, v. 34, p. 1–18, 1991.

DOVER, C. L. V.; WARD, M. E.; SCOTT, J. L.; UNDERDOWN, J.; ANDERSON, B.; GUSTAFSON, C.; WHALEN, M. E; CARNEGIE, R. B. A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. **Marine Ecology**, v. 28, n. 1, p. 54-62, 2007.

EDITORIAL. Cause and effect. **Nature Reviews Microbiology** .v.4, n. 414, 2006.

ESPINEL-INGROFF, A.; GOLDSON, P. R.; MCGINNIS, M. R.; KERKERING, T. M. Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 301–307, 1988.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T. M.; SHADOMY, J. Isolation of dematiaceous pathogenic fungi from a feed and seed warehouse. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 714–719, 1982.

FACTOR, J. R.; BEEKMAN, J. The digestive system of the lobster, *Homarus americanus*: III. Removal of foreign particles from the blood by fixed phagocytes of the digestive gland. **Journal of Morphology**, v. 206, p. 293-302, 1990.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity — a personal recollection 15 years later. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 67–72, 2004.

FAO (Food and Agriculture Organization). Report and Proceedings of the Expert Workshop on DNA-based Molecular Diagnostic Techniques: Research Needs for Standardization and Validation of the Detection of Aquatic Animal Pathogens and Diseases. **Fisheries Technical Paper**, n. 395, Bangkok, 1999.

FENG, B.; WANG, X.; HAUSER, M.; KAUFMANN, S.; JENTSCH, S.; HAASE, G.; BECKER, J. M.; SZANISZLO, P. J. *WdPKS1* encodes a polyketide synthase involved in dihydroxynaphthalene (DHN) melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1782–1794, 2001.

GEIS, P.A.; SZANISZLO, P.J. Carotenoid pigments in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. **Mycologia**, v. 76, p. 268-273, 1984.

HARRIS, R. R.; SANTOS, M. C. F. Sodium uptake and transport (Na⁺K⁺) ATPase changes following Na⁺ depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 105, p. 35-42, 1993.

HOOG, G. S. DE. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105-109, 1993.

HOOG, G. S. DE. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycosis**, v. 40, n. 2, p. 5-8, 1997.

HOOG, G. S. DE; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; EL-FARI, M.; GERRITS, VAN DER ENDE A. H. G.; MELZER-KRICK, B.; UNTEREINER, W. A. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**, v. 36, p. 52–56, 1998.

HOOG, G. S. DE; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili, Baarn/ Reus, ed. 2º, 720 p., 1995.

HOOG, G. S. DE; TAKEO, K.; YOSHIDA, S.; GÖTTLICH, E.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Pleoanamorphic life cycle of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, p. 145-153, 1994.

HOROBIN, R. W.; BANCROFT, J. D. **Troubleshooting histology stains**. Churchill Livingstone, New York, p.266, 1998.

HUMASON, G. L. **Animal tissue techniques**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, ed. 4º, 661 p., 1979.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v. 75, p. 149–58, 1981.

JOHANSSON, M.W.; SÖDERHÄLL, K. Cellular immunity in Crustaceans and the proPO system. **Parasitology Today**, v. 5, n. 6, p. 171-176, 1989.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. **Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte**. v. 2, p. 1-88, 1884.

KRALOVIC, S.M.; RHODES, J.C. Phaeohyphomycosis caused by *Dactylaria* (human dactylariosis): report of a case with review of the literature. **Journal of Infection**, v. 31, p. 107–113, 1995.

LINDSLEY, M. D.; HURST, S. F.; IQBAL, N. J.; MORRISON, C. J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3505-3511, 2001.

MÜLLER, E.; PETRINI, O.; FISHER, P. J.; SAMUELS, G. J.; ROSSMAN, A. Y. Taxonomy and anamorphs of the Herpotrichiellaceae with notes of generic synonymy. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 63-74, 1987.

NIEVES-RIVERA, A.M. **Coastal mycology of Puerto Rico: A survey and biological aspects of marine, estuarine, and mangrove fungi**. Dissertation. University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 382 p., 2005.

NORDHAUS, I. **Feeding ecology of the semi-terrestrial crab *U. cordatus* (Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil.** Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen, 217p., 2003.

OHORI, A.; ENDO, S.; SANO, A.; YOKOYAMA, K.; YARITA, K.; YAMAGUCHI, M.; KAMEI, M.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 359–365, 2005.

OUJEZDSKY, K. B; GROVE, S. N.; SZANISZLO, P. J. Morphological and structural changes during the yeast-to-mold conversion of *Phialophora dermatitidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 113, p. 468-477, 1973.

REVISTA DO GIA (GRUPO INTEGRADO DE AQUICULTURA E ESTUDOS AMBIENTAIS). **Desvendando uma tragédia nos manguezais brasileiros**, v. 2, 49p. <http://gia.locaweb.com.Br/paginas/index.php?p=publicações&id=34>, 2006.

SILVA, J. L. M. DA; ANDREOTTI, P. F.; SUVA, J. F.; SCARES, C. P.; CACERE, C. R.; BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Epithelial cells by paracoccidioides brasiliensis and some components. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 14, 2005.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-23, 1992.

SPARKS, A. K. Observations on the histopathology and probable progression of the disease caused by *Trichomarix invadens*, an invasive ascomycete, in the tanner crab, *Chionoecetes bairdi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 242-254, 1982.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Identification of *Trichosporon asahii* by PCR based on sequences of the internal transcribed spacer regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2742-2744, 1998.

TERWILLIGER, N.B. Hemocyanins and the immune response: defense against the dark arts. **Integrative and Comparative Biology**, v. 47, n. 4, p. 662-665, 2007.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.** Tese (doutorado em Agronomia, Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, 181 p., 2000.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 2, p. 338–387, 1988.

ANEXO

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS INVESTIGAÇÕES
MICROBIOLÓGICAS1. **Ágar Infusão Cérebro Coração (Brain Heart Infusion - BHI)**

Ágar de infusão de cérebro e coração de bezerro (Himedia®)	52g
Água destilada	1000mL

2. **Ágar Micobiótico ("Mycosel")**

Dextrose (Pronadisa®)	10g
Peptona de soja (Pronadisa®)	10g
Cloranfenicol (Pronadisa®)	0,05g
Ciclohexamida (Pronadisa®)	0,4g
Ágar Bacteriológico Pronadisa®)	15,5g
Água destilada	1000mL

3. **Ágar Sabouraud Dextrosado**

Dextrose (Himedia®)	40g
Neopeptona (Himedia®)	10g
Agar Bacteriológico (Himedia®)	15g
Água destilada	1000mL

4. **Gel de agarose 1,5%**

Agarose (Invitrogen™)	0,9g
Tampão TBE	60mL

5. **Solução AFA**

Ácido acético (glacial)(Synth)	5mL
Etanol 70% (Merck)	85mL
Formalina 37-40%(Vetec)	10mL

6. **Solução DMSO-EDTA**

EDTA (Invitrogen™)	74,4g
Água destilada	800mL

*O pH foi ajustado para 8,5 com NaOH (Issofar) 1N.

DMSO (Mallinckrodt)	200mL
---------------------	-------

*Adicionou-se NaCl (J.T.Baker) até saturar; pH final foi ajustado para 8,5 com NaCl 1N.

7. Solução Inóculo*Elementos miceliais e células
leveduriformes***2 x 10⁷***Tween® 20 (Promega®)***0,05mL***Solução salina (2,5%)***4,5mL****8. Solução Salina***NaCl (J.T.Baker)***2,5g***Água destilada***100mL****9. Tampão CTAB***Tris-base (Invitrogen™)***2,5g***NaCl (J.T.Baker)***100mL***EDTA (Invitrogen™)**Água destilada*

*O pH final foi ajustado para 7,5 com HCl (Vetec) 1N.

10. Tampão TBE (10x)*Tris-base (Invitrogen™)***108g***EDTA (Invitrogen™)***9,3g***Ácido Bórico (Amresco)***55g***Água destilada***1000mL****11. Tampão TE***Tris-HCl (Invitrogen™) pH 8,0***20mM***EDTA (Invitrogen™) pH 8,0***20mM**

3 DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO: TESTE DE ETIOLOGIA VIRAL

RESUMO

O amplo histórico de doenças de origem viral em crustáceos, nutre pressuposições de uma etiologia viral para Doença do Caranguejo Letárgico (DCL). Hipótese que também se sustenta na alta probabilidade dessas infecções serem ocultas por outros organismos oportunistas, que acabam assumindo o papel de agente patogênico primário. Por estes motivos, esse estudo teve por objetivo testar essas suposições através de bioensaios. Espécimes sadios de *Ucides cordatus* foram inoculados com uma solução proveniente da maceração e filtragem de tecidos de animais moribundos. Mortes foram registradas apenas nos animais que compunham os tratamentos de controle (n=4). Portanto, comprovou-se a inexistência de partículas virais nos *U. cordatus* mortos em decorrência de eventos de DCL.

Palavras-chave: etiologia viral. DCL. Bioensaios.

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as diagnoses de infecções exigem investigações mais acuradas de uma possível origem viral, uma vez que essa pode comprometer os mecanismos de resistência do hospedeiro, sendo posteriormente sobrepujada por microrganismos oportunistas do entorno que acabam por assumir uma aparente identidade de agente patogênico primário (ANDERSON *et al.*, 1987; BROCK, 1992; LIGHTNER, 1996).

Esse cenário tornou-se trivial em crustáceos, cujo amplo histórico de infecções virais registradas durante as décadas de 70 e 80 (BONAMI, 1980; JOHNSON, 1984; MARI e BONAMI, 1986; ADAMS e BONAMI, 1991) conduzem a uma maior atenção nas investigações de enfermidades desse grupo. Durante esse período, quando as criações de camarão (carciniculturas) eram incipientes, problemas patológicos eram escassos nesses organismos e, portanto, caranguejos foram utilizados como modelos biológicos nos estudos. Atualmente, pouco se conhece a respeito de viroses em caranguejos, embora diversas doenças virais em camarões tenham sido descritas, havendo uma forte correlação das mesmas com o crescimento da atividade de carcinicultura (LIGHTNER, 1996; 1999). Afinal, para qualquer espécie aquática, a transição de uma ambiente selvagem para um sistema de monocultivo controlado pode ser acompanhada por diversas mudanças (elevadas densidades populacionais, freqüente degradação do ambiente do sistema de cultivo,

mistura de populações de diferentes origens) que aumentam a probabilidade de mortandades decorrentes de sérias doenças (PINHEIRO *et al.*, 2007).

No Brasil, a carcinicultura marinha experimentou um crescimento extraordinário a partir da introdução do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (originário do leste do Pacífico, incluindo a costa do Golfo do México até o Peru) no ano de 1982 no estado da Bahia, expandindo-se posteriormente para outros estados do país (BUENO, 1989; PONTES, 2006). Um recente levantamento da FAO (Food and Agriculture Organization), inclui o Brasil na lista dos maiores produtores mundiais, enfatizando o grande aumento da produção do país nos últimos anos (FIGIS / FAO, 2007). Em 2003, o Brasil produziu 90 mil toneladas de camarão, exportando o equivalente a 69% desta produção para os Estados Unidos e Europa, o que gerou um faturamento de 220 milhões de dólares (ABCC, 2004).

Contudo, a sustentabilidade desses cultivos de camarões nas Américas encontra-se ameaçada pelas doenças virais (FIGURA 22). Além das consequências econômicas, estudos apontam riscos destas enfermidades afetarem outros organismos do ecossistema estuarino. O agente responsável pela Síndrome da Mancha Branca (WSD - White Spot Disease), por exemplo, apresentou uma característica incomum à maioria dos vírus, um baixo grau de especificidade, ou seja, infecções cruzadas em outros crustáceos (caranguejos e lagostas) poderiam apresentar uma função na epidemiologia do mesmo (LO *et al.*, 1996; RAJENDRAN *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2000).

VÍRUS	TIPO	FAMÍLIA	GRUPO	DIÂMETRO(µM)
WSSV	fdDNA	<i>Nimaviridae</i>	<i>Whispovirus</i>	0,23 x 0,08
IHHNV	fsDNA	<i>Parvoviridae</i>	<i>Brevidensovirus</i>	0,022
TSV	fsRNA	<i>Dicistroviridae</i>	<i>Cripavirus</i>	0,032
YHDV	fsRNA	<i>Roniviridae</i>	<i>Okavirus</i>	0,15 x 0,048
IMNV	fdRNA	<i>Totiviridae</i>	<i>Myonecavirus</i>	0,04

FIGURA 22- PRINCIPAIS AGENTES VIRAIS QUE AFETAM CULTIVOS DE CAMARÕES NAS AMÉRICAS (LIGHTNER, 1999; BRIGGS ET AL., 2004)

FONTE: O autor (2008)

Schaeffer-Novelli *et al.* (2004) realizaram uma comparação simples entre os sintomas registrados nas principais doenças virais em camarões cultivados e os sinais macroscópicos apresentados pelos caranguejos *Ucides cordatus* (mortos e moribundos) durante eventos da Doença do Caranguejo Letárgico (DCL). Com base

nas coincidências observadas entre os sinais clínicos dessas enfermidades levantaram a hipótese de uma origem viral para o agente etiológico da DCL.

Assim, o objetivo do presente estudo é a aplicação de um bioensaio que permita a detecção de um possível agente etiológico viral em tecidos procedentes de *U. cordatus* afetados pela DCL.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Desenho experimental

Os ensaios descritos foram realizados no Laboratório de Aquários do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Os animais experimentais foram mantidos sob as mesmas condições dos espécimes submetidos aos ensaios de infecção não-contínua e contínua, descritas no capítulo 2 (item 2.2.1).

Foram utilizados um total de 26 *U. cordatus* sadios (coletados no litoral paranaense, Ilha das Peças, Baía de Antonina, PR), sendo 10 deles inoculados com 1mL de solução proveniente da maceração e filtragem do hepatopâncreas (20-30g) de espécimes com DCL (coletados no estado da Bahia). Neste procedimento, o tecido macerado foi filtrado em disco de papel Whatman® (2,5 µm) com auxílio de bomba de vácuo QUIMIS®, e filtro Millipore® 0,2 µm, após centrifugação a 3.500 rpm por 5 minutos (adaptado de Hasson *et al.*, 1995) (FIGURA 23). Os tratamentos controle apresentaram a mesma quantidade de animais utilizada nos bioensaios de infecção artificial (16 espécimes). Posteriormente, foram analisadas as taxas de mortalidade e padrões histológicos.

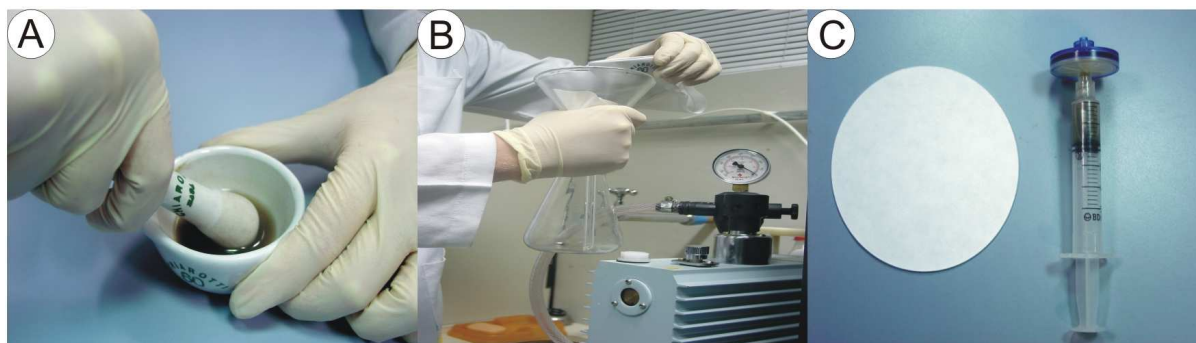


FIGURA 23 (A-C)- MACERAÇÃO DO HEPATOPÂNCREAS DE *Ucides cordatus* COM PISTILO (A), E POSTERIOR FILTRAGEM COM AUXÍLIO DE BOMBA DE VÁCUO (B) EM FILTROS 2,5 µm E 0,2 µm (C)

FONTE: O autor (2008)

3.3 RESULTADOS

As taxas de mortalidade nos tratamentos de controle negativo com inoculação de solução salina ou injeção apenas da agulha, apresentaram valores de 33,3% e 11,1% (n=3 e n=1), respectivamente (FIGURA 24). Entretanto, nenhum caranguejo inoculado com a solução resultante da filtragem do hepatopâncreas de um animal com DCL morreu. Além disso, as análises histológicas das brânquias dos *U. cordatus* pertencentes a esse tratamento, não apontaram nenhum efeito citopático, como claramente observado na comparação com as lamelas branquiais de um espécime do caranguejo *Scylla serrata* infectado artificialmente com o vírus WSSV (RAJENDRAN *et al.*, 1999) (FIGURA 25).

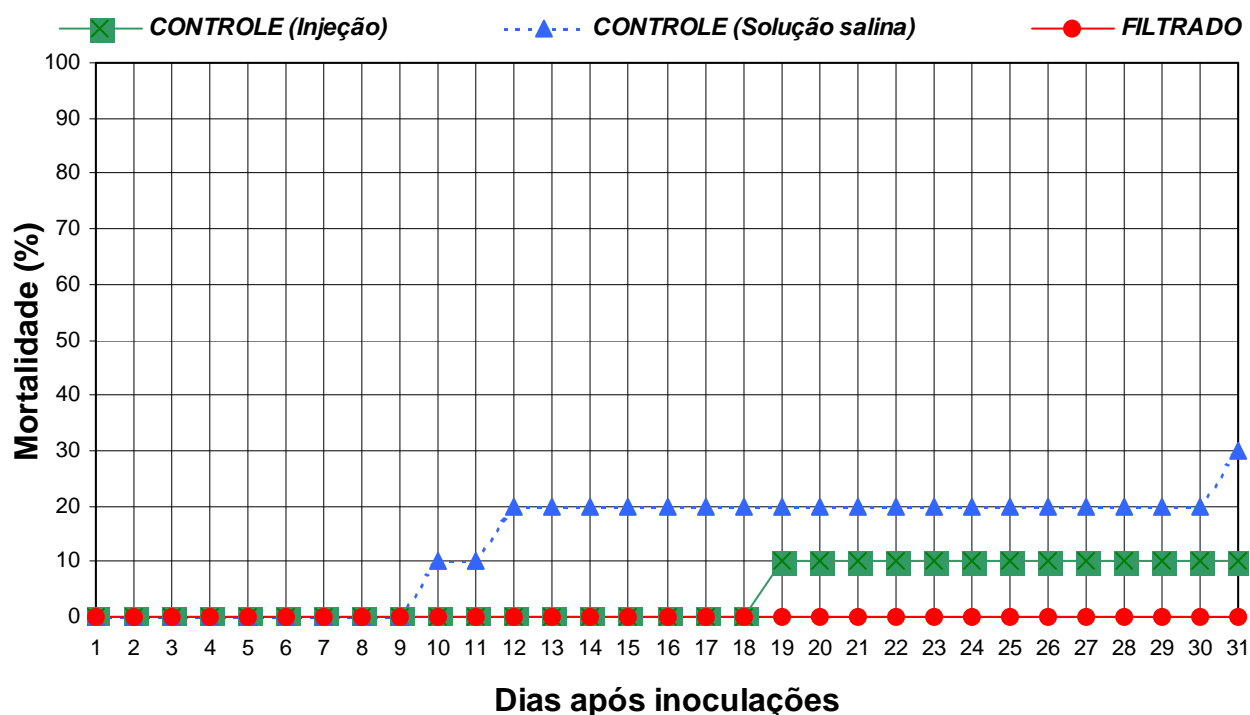


FIGURA 24- DETALHAMENTO DOS NÍVEIS DE MORTALIDADE NOS TRATAMENTOS REFERENTES AO TESTE DE ETIOLOGIA VIRAL
FONTE: O autor (2008)

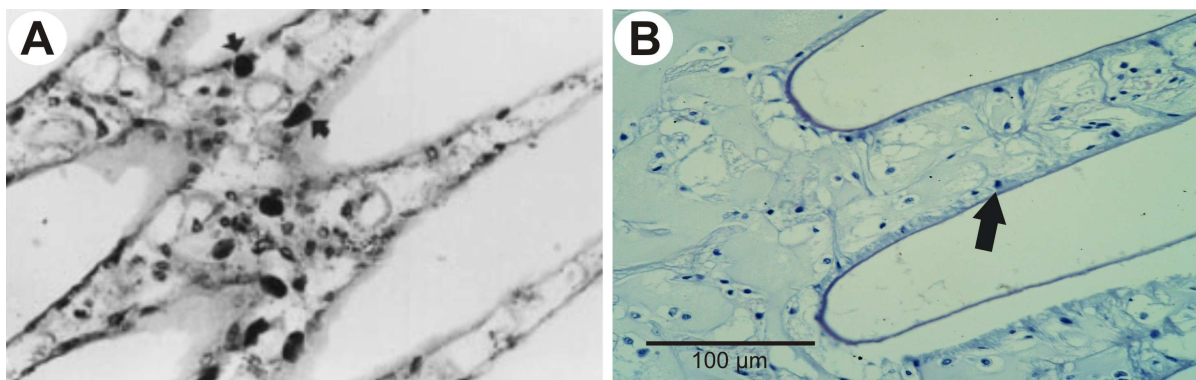


FIGURA 25 (A-B)- (A). LAMELAS BRANQUIAIS DO CARANGUEJO *Scylla serrata* INFECTADO EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS **WSSV** DEMONSTRANDO NÚCLEOS HIPERTROFIADOS COM INCLUSÕES VIRAIS (SETAS) (400X). (B). LAMELAS BRANQUIAIS DE ESPÉCIMES DE *Ucides cordatus* SUBMETIDOS AO TESTE DE ETIOLOGIA VIRAL DO PRESENTE ESTUDO. NÃO SÃO OBSERVADOS SINAIS CITOPÁTICOS

FONTE: (A) RAJENDRAN *et al.* (1999); (B) O autor (2008)

3.4 DISCUSSÃO

O estudo demonstrou por meio de bioensaios específicos a não existência de partículas virais na solução filtrada de amostras de hepatopâncreas provenientes de *U. cordatus* moribundos em eventos da enfermidade. Os resultados destes testes foram corroborados pela taxa de mortalidade nula dos animais sadios inoculados, assim como o perfil histológico exibido por estes caranguejos, onde não foram observados efeitos citopáticos, como hipertrofias nucleares, comuns aos crustáceos infectados por vírus (RAJENDRAN *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1998).

Assim, o presente trabalho claramente refuta a hipótese proposta por Schaeffer-Novelli *et al.* (2004), suportando a etiologia fúngica da DCL apresentada por Boeger *et al.* (2005, 2007) e apontando para necessidade de novos estudos direcionados a compreensão de aspectos epidemiológicos desta levedura negra (*Exophiala* sp.).

REFERÊNCIAS

ANDERSON, I. G.; SHARIFF, M.; NASH, G.; NASH, M. Mortalities of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus, rickettsia and bacterial infections, from Malaysian brackish water ponds. **Asian Fisheries Science**, v. 1, p. 47–64, 1987.

ADAMS J. R.; BONAMI J. R. **Atlas of Invertebrate Viruses**. CRC Press, Boca Raton, FL., 1991.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). A carcinocultura brasileira. **Revista da ABCC**, v. 1, p. 30-45, 2004.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 161-167, 2005.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; VICENTE, V. A.; OSTRENSKY, A.; HUNGRIA, D.; CASTILHO, G. G. Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 73-81, 2007.

BONAMI, J. R. **Recherches sur les infections virales des crustacée marins: étude des maladies à étiologie simple et complexe chez les décapodes des côtes françaises**. Tese. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1980.

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Ásia and the Pacific. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO)**. RAP Publications, v. 10, 88 p., Bangkok, 2004.

BROCK, J. A. Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. In: Fulks, W., Main K. (Eds.), **Proceedings of the Asian Interchange Program Workshop on the Diseases of Cultured Penaeid Shrimp**. Asian Interchange Program, The Oceanic Institute, Oahu, HI, p. 209–231, 1992.

BUENO, S. L. S. Técnicas, procedimentos e manejo para a produção de pós-larvas de camarões peneídeos: experiência vivida pela Maricultura da Bahia S.A. Brasília, **Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM - Brasil)**, 107 p., 1989.

FIGIS - Fisheries Global Information System; **FAO** database, <http://www.fao.org/fi/figis/>, 2007.

HASSON, K.; LIGHTNER, D. V.; POULOS, B.; REDMAN, R.; WHITE, B.; BROCK, J.; BONAMI, J. Taura syndrome in *penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 115-126, 1995.

JOHNSON, P. T. Viral diseases of marine invertebrates. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 37, p. 65–98, 1984.

LIGHTNER, D. V. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. **Special Publication of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, L.A., 1996.

LIGHTNER, D. V. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, p. 27-52, 1999.

LO, C. F.; LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; KOU, G. H. Detection of baculovirus with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133–141, 1996.

MARI, J.; BONAMI, J. R. Les infections virales du crabe *Carcinus mediterraneus* Czerniavski, 1884. In: Pathology in Marine Aquaculture, ed. by C.P. Vivares, J.R. Bonami & E. Jaspers, pp. 283–293. **European Aquaculture Society**, Special Publication, n. 9, Bredene, Belgium, 1986.

PARK, J. H.; LEE, Y. S.; LEE, Y. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 71–75, 1998.

PINHEIRO, A. C. A. S.; LIMA, A. P. S.; SOUZA, M. E.; NETO, E. C. L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES, V.S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v. 262, n. 1, p. 17-22, 2007.

PONTES, C. S. Displacement pattern of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) in light and dark phases during a 24-hour period. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, 2006.

RAJENDRAN, K. V.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T. C.; KROL, R. M. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 3, p. 183-191, 1999.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO. G.; COELHO-JR, C.; ALMEIDA, R.; MENGHINI, R. P. A mortandade de caranguejo-do-mangue no Nordeste do Brasil: Evidências circunstanciais para uma epizootia com origem relacionada à produção de camarão peneídeo marinho. **II Simpósio Brasileiro de Oceanografia**, São Paulo, 2004.

SHI, Z.; HUANG, C.; ZHANG, J.; CHEN, D.; BONAMI, J. R. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. **Journal of Fish Diseases**, v. 23, p. 285–288, 2000.

4 DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA TOLERÂNCIA DO AGENTE ETIOLÓGICO A DIFERENTES SALINIDADES

RESUMO

Em função de sua baixa habilidade competitiva, as leveduras negras, membros de *Herpotrichiellaceae*, aparentam ter adotado como estratégia evolutiva a escolha de habitats incomuns. O gênero do agente responsável pela DCL, por exemplo, teve sua descrição baseada em espécies marinhas. Portanto, o presente estudo apresentou como objetivo, avaliar a tolerância desse agente (*Exophiala sp.*) a diversas salinidades, por diferentes períodos de exposição, testando-se assim, uma hipótese de dispersão marinha. Como resultado dos ensaios *in vitro*, as análises de variância (ANOVA) de dois fatores (Salinidade x Intervalos de exposição) e teste de Fisher (agrupamentos baseados na D.M.S.), destacaram uma significativa influência negativa das salinidades no crescimento das colônias ($p=0,044$). Contudo, o dado mais relevante, foi a elevada taxa de reprodução que *Exophiala sp.* demonstrou durante o mais longo intervalo de exposição (1 semana), o que torna plausível a dispersão marinha deste agente. Fato que contribui para compreensão da distribuição desta enfermidade ao longo da costa brasileira.

Palavras-chave: DCL. *Exophiala sp.* Halotolerância.

4.1 INTRODUÇÃO

Os membros de *Herpotrichiellaceae* parecem ter pouca habilidade competitiva. Para resolução deste problema, espécies dessa família adotaram duas estratégias diferentes: a escolha de substratos incomuns (específicos) ou de habitats que reprimam competidores, como águas pobres em nutrientes e superfícies de rochas (HOOG, 1993).

Nas espécies de *Exophiala*, a notável plasticidade morfológica (determinada pelas condições ambientais), assim como a capacidade de crescimento destas espécies em baixas concentrações de oxigênio, provavelmente refletem essa inabilidade competitiva (HOOG, 1993). O gênero foi proposto por Carmichael (1966) com base na espécie *Exophiala salmonis*, encontrada na água marinha e responsável por uma infecção sistêmica em trutas. Subseqüentemente, outros dois patógenos de peixes foram descritos, *E. pisciphila* (MCGINNIS e AJELLO, 1974) e *E. psychrophila* (PEDERSEN e LANGVAD, 1989). Filogeneticamente, as 3 espécies agrupam-se em um mesmo clado, o que pode ser suportado pelo compartilhamento do habitat representado por ambientes frios (UIJTHOF, 1996).

Recentemente, uma nova espécie de *Exophiala*, que compartilha hospedeiros de sangue frio, foi considerada responsável pelas mortandades de caranguejos-uçá, *Ucides cordatus*, em diversos manguezais nordestinos. Em função do padrão de distribuição destes eventos, levantou-se a hipótese de uma possível dispersão marinha do agente etiológico desta enfermidade, denominada Doença do Caranguejo Letárgico (DCL) (BOEGER *et al.*, 2005). Sob esse cenário, se este agente (*Exophiala* sp.) é capaz de resistir a altas salinidades por extenso período de tempo, a doença pode propagar-se extensivamente, afetando estuários distantes. Entretanto, se *Exophiala* sp. é apenas viável por poucas horas nas salinidades observadas em ambientes marinhos, esta limitação poderia restringir severamente sua dispersão para estuários adjacentes.

Portanto, avaliar a tolerância a salinidades marinhas dessa espécie patogênica é fundamental para a compreensão epidemiológica da DCL. Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar a tolerância a salinidades elevadas por diversos períodos de tempo (1 hora, 1 dia e 1 semana) através de um modelo experimental baseado em bioensaios *in vitro*, simulando assim, uma hipótese de dispersão da enfermidade em ambientes naturais.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Linhagem

A linhagem avaliada nos ensaios (*Exophiala* sp.) foi isolada de caranguejos moribundos, durante eventos de mortandade nos estados da Bahia e Sergipe (início de 2004 e 2005) (BOEGER *et al.*; 2005, 2007) de acordo com o método de Iwatsu (IWATSU *et al.*, 1981). Posteriormente, pequenos fragmentos miceliais desta linhagem estocada em Ágar Sabouraud Dextrosado (Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná) foram plaqueados em meio Mycosel e incubados por duas semanas (25°C). As células leveduriformes e elementos de hifas obtidos nestas culturas foram suspensos em solução salina (2,5%) com 1% de Tween® 20 (Promega®), manipulações efetuadas em fluxo laminar LabCon Co. (Purifier Class II). Como resultado obteve-se uma solução estoque de aproximadamente 2×10^7 UFC/mL, contados na câmara de Neubauer (Optik Labor) com auxílio de

microscópio de contraste de fase em aumento de 400x (Olympus BX51) (adaptado de Iwatsu *et al.*, 1981).

4.2.2 Tratamentos

Alíquotas (50 µL) da diluição (1:10) da solução estoque foram acrescentadas em 1mL de água marinha esterilizada com diferentes níveis de salinidade, ajustadas por meio de evaporação (em estufa) e diluições (com água ultrapura). As soluções resultantes compuseram, assim, os tratamentos A, B, C e D (0, 10, 25, 38 ppm, respectivamente), acondicionados em microtubos (1,5mL cada, 15 microtubos por tratamento).

4.2.3 Tempo de exposição

Todos os microtubos foram incubados à 25°C. Cinco microtubos de cada tratamento foram removidos da estufa após 1 hora, 24 horas e 7 dias. Esse procedimento permitiu avaliar a extensão temporal da viabilidade das UFCs expostas a diferentes salinidades.

4.2.4 Avaliação do crescimento das colônias

Após os períodos de exposição, o conteúdo dos microtubos foi plaqueado em meio Mycosel. Posteriormente aos 14 dias de incubação (25°C), fotos digitais (Sony MVC-CD500) das 60 placas de Petri (90x15mm) resultantes foram analisadas. Os espaços ocupados nas placas pelas colônias leveduriformes foram determinados pelo número de píxeis (menor unidade de uma imagem digital) com o auxílio de ferramentas do programa SigmaScan® Pro 5.0 (Systat Software Inc.). Todas as imagens foram convertidas para escalas de cinza, padronizando-se a aferição apenas dos elementos com limiar de intensidade superior a 60 píxeis. Posteriormente, o conjunto de áreas mensuradas foi submetido à análise de variância (ANOVA) de dois fatores (Intervalos de exposição x Salinidades) e testes de diferenças mínimas significativas (D.M.S.) de Fisher, realizados no software STATISTICA © 6.0 (StatSoft Inc.).

4.3 RESULTADOS

Todos os tratamentos deste experimento apresentaram crescimento de colônias leveduriformes, não importando os períodos de exposição de *Exophiala* sp. às diferentes salinidades. Entretanto, notáveis discrepâncias quantitativas destas colônias foram observadas nesses intervalos de tempo.

A ANOVA destacou a maior influência dos intervalos de exposição ($p < 0,001$) no crescimento das colônias em comparação às salinidades, que apesar do efeito menos aparente, também apresentaram um valor estatístico significativo ($p = 0,044$). Nem mesmo a interação desses dois fatores demonstrou influência tão evidente sobre o crescimento ($p = 0,026$) (TABELA 4).

TABELA 1- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE DOIS FATORES (INTERVALOS DE EXPOSIÇÃO X SALINIDADES). SQ= SOMA DOS QUADRADOS; GL= GRAUS DE LIBERDADE; QM= QUADRADO MÉDIO; F= ESTATÍSTICA DO TESTE F; p = VALOR DA PROBABILIDADE

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Salinidades	112 ⁵	3	375 ⁴	2,92	0,044
Intervalos de exposição	167 ⁶	2	835 ⁵	65,02	<0,001
Salinidades x Intervalos	206 ⁵	6	343 ⁴	2,67	0,026

FONTE: O autor (2008)

Segundo o critério da D.M.S., foi possível observar na análise da influência conjunta dos intervalos de exposição e das salinidades, a ausência de diferenças nas médias de crescimento (agrupadas em “A”) em 1h e 24h, ou seja, nenhum efeito significativo desses fatores foi expresso. Contudo, após 168h (1 semana), tornou-se nítido o abrupto aumento nas médias de crescimento em função de uma surpreendente reprodução dessas leveduras negras, que passaram a abranger áreas 16 vezes maiores, em média (agrupando-se em “B”, “C” e “D”). Além disso, neste intervalo, observou-se a formação de um gradiente de tolerância entre as salinidades, iniciando-se com uma ótima resistência das unidades formadoras de colônias expostas a 0 ppm (Grupo “D”) e finalizando com a menor tolerância a 38 ppm (Grupo “A”), preenchendo assim, respectivamente, 5.888,9 mm² (quase a totalidade da placa, 6358, 5mm²) e 2.519, 7 mm² (TABELA 5) (FIGURAS 26,27).

TABELA 2- AGRUPAMENTO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS NOS DIFERENTES INTERVALOS DE EXPOSIÇÃO E SALINIDADES DE ACORDO COM A D.M.S DO TESTE DE FISHER

Intervalos de exposição (h)	Salinidades (ppm)	Média do crescimento das colônias (mm ²)	Grupos homogêneos			
			A	B	C	D
1	38	293,778	■			
1	25	371,925				
1	10	303,335				
1	0	407,239				
24	38	140,885				
24	25	274,304				
24	10	266,164				
24	0	241,123				
168	38	2.519,725		■		
168	25	3.056,060		■	■	
168	10	4.000,057			■	
168	0	5.888,872				■

FONTE:
(2008)

○ autor

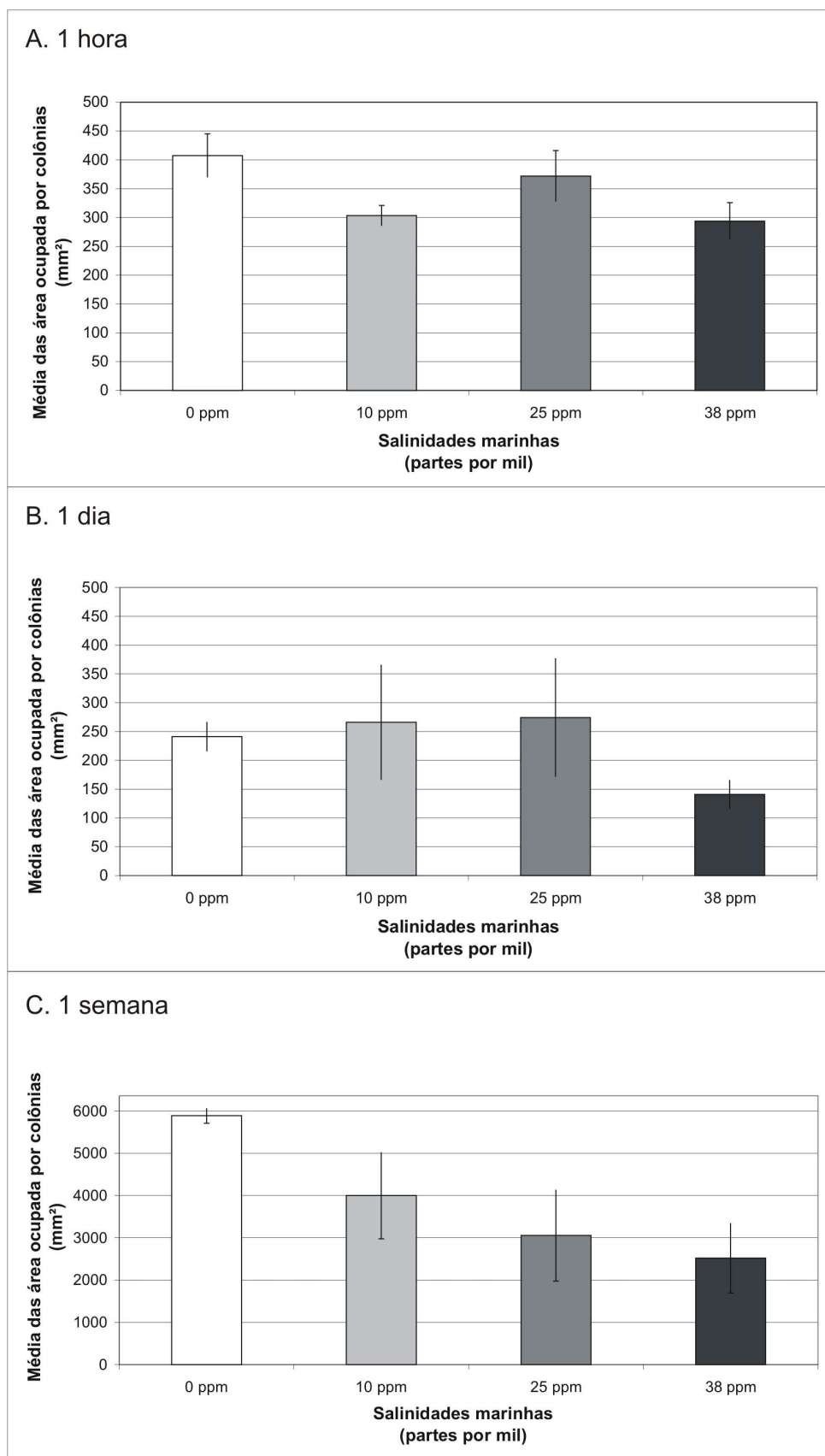


FIGURA 26 (A-C)- REPRESENTAÇÃO DA MÉDIA DAS ÁREAS PREENCHIDAS EM PLACAS DE PETRI POR UFCs DE *Exophiala* sp. PREVIAMENTE EXPOSTAS A DIFERENTES GRAUS DE SALINIDADE PELO PERÍODO DE: (A) 1 HORA; (B) 1 DIA E (C) 1 SEMANA. BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO DOS DADOS
FONTE: O autor (2008)

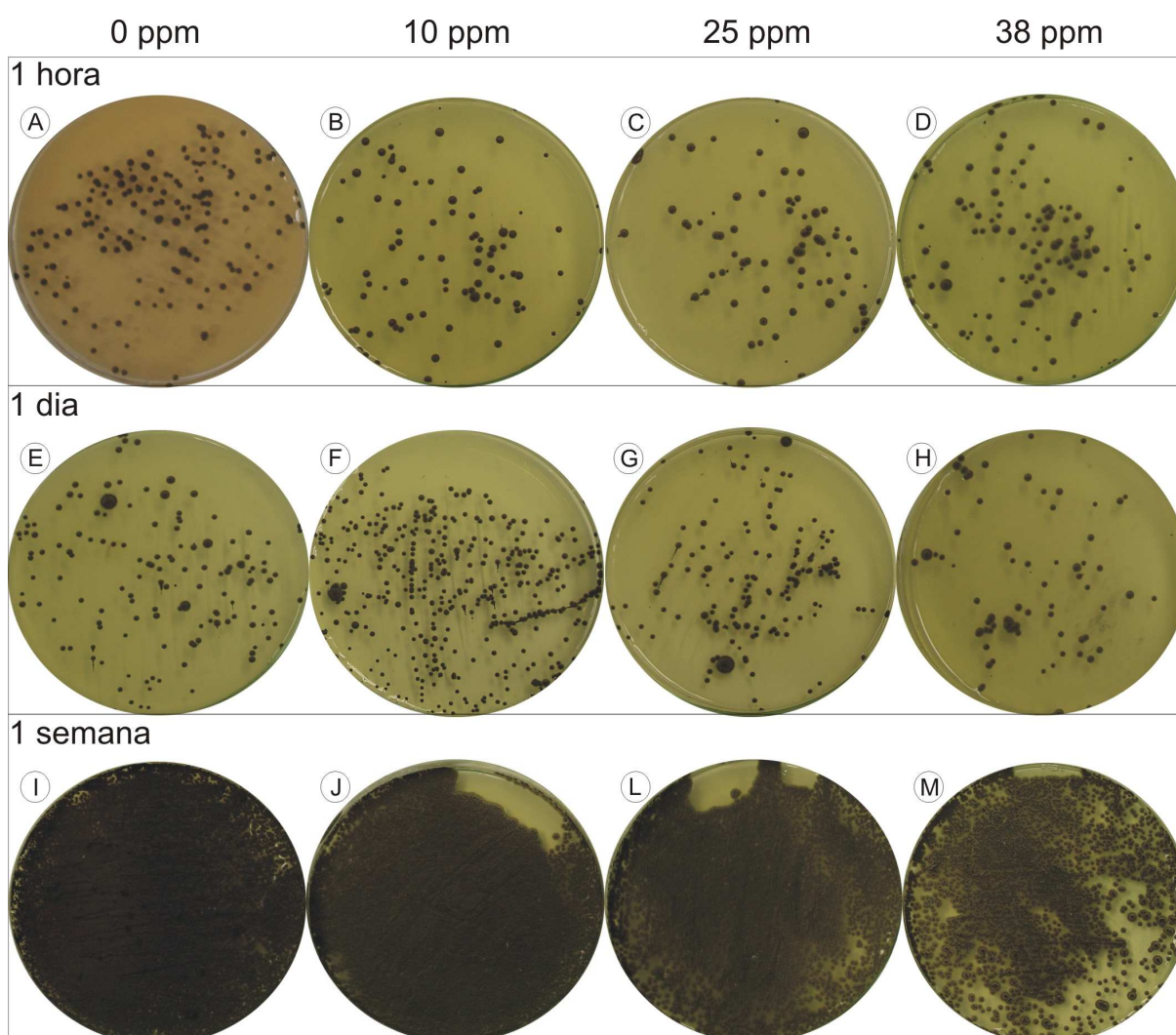


FIGURA 27(A-M)- PADRÃO DE CRESCIMENTO DAS UFCs PREVIAMENTE EXPOSTAS POR 1 HORA AS DIFERENTES SALINIDADES:(A) 0 PPM;(B)10 PPM; (C) 25 PPM E (D) 38 PPM; EXPOSTAS POR 24 HORAS: (E) 0 PPM; (F) 10 PPM; (G) 25 PPM E (H) 38 PPM; E EXPOSTAS POR 1 SEMANA: (I) 0 PPM; (J) 10 PPM; (L) 25 PPM E (M) 38 PPM

4.4 DISCUSSÃO

Bacteria e Archaea dominam ambientes naturais caracterizados por propriedades físico-químicas extremas. Entretanto, as leveduras negras (fungos dematiáceos) também desafiam os limites, representando um notável modelo de adaptação de microrganismos eucarióticos a certos ambientes extremos (WOLLENZIEN *et al.*,1995; GUNDE-CIMERMAN *et al.* 2000). No presente estudo, o fungo dematiáceo *Exophiala* sp., considerado responsável por diversos eventos de mortandade do caranguejo-uçá, demonstrou uma notável halotolerância ao reproduzir-se durante longo período de exposição (1 semana) ao estresse osmótico

de uma elevada salinidade marinha (38 ppm), registrada apenas em períodos secos da região nordeste brasileira (LACERDA e MARINS, 2002). Confirmando-se assim, a possibilidade de dispersão marinha do agente etiológico da DCL.

Embora as leveduras negras sejam conhecidas desde o final do século 19 (HOOG et al., 1999), dificuldades na sua identificação morfológica aliadas ao seu crescimento lento e baixa habilidade competitiva, freqüentemente prejudicam o isolamento e a identificação destes fungos (GUNDE-CIMERMAN e PLEMENITAS, 2005). Contudo, nas últimas décadas, fungos dematiáceos foram encontrados habitando os mais diversos ambientes, tais como o deserto do Arizona (USA) (STALEY et al., 1981; PALMER et al., 1987), a Antártica (NIENOW e FRIEDMANN, 1993), além de diversos tipos de rochas em ambientes áridos e semi-áridos (mármore, granito, etc.) (STERFLINGER et al., 1999).

Ao avaliar a osmotolerância de leveduras negras isoladas do ambiente (solo, madeira e cobertura vegetal em decomposição), Vicente (2000) relatou que as linhagens de *Exophiala* incubadas por 2 semanas a 24°C em meio líquido (Saboraud) com diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) e Cloreto de Sódio (NaCl), resistiram a 100 ppm de ambos os sais. Sterflinger (1998) detectou em leveduras negras do mesmo gênero, no entanto, habitantes de rochas, o crescimento de colônias após serem expostas 4 semanas a uma concentração de Cloreto de Sódio (NaCl) de 105 ppm quando incubadas a 18°C e 70 ppm quando mantidos a 27°C. Neste mesmo estudo, foram mensuradas as acumulações intracelulares do dissacarídeo trehalose, responsável por estabilizar enzimas e membranas sob ação de elevadas temperaturas e, glicerol, principal osmólito produzido em células fúngicas sob condição de estresse por NaCl. Como resultado da ação sinérgica destas duas fontes de estresse, observou-se que a maioria dos nutrientes disponíveis são transformados em glicerol para estabilizar o potencial osmótico e, o conteúdo de trehalose, não é suficiente para estabilização das células, o que diminui a temperatura letal das leveduras negras, ou seja, NaCl claramente deve ser considerado como um fator estressante adicional, diminuindo a velocidade de crescimento.

No contexto da DCL, a aplicação destas análises pode elucidar o limite de distribuição da enfermidade ao Norte do Brasil. Ou seja, o aumento da temperatura da água nas proximidades da linha Equatorial (aproximadamente 30°C, segundo LI e

PHILANDER, 1996), aliado ao estresse da salinidade marinha, pode ser o fator responsável por essa restrição espacial.

Outros fatores estão envolvidos na tolerância dos fungos dematiáceos a diversas fontes de estresse. Em estudos de microscopia eletrônica de transmissão, Sterflinger (1998) observou que camadas de parede espessa são sintetizadas em leveduras negras submetidas a condições de estresse, podendo assim, ser considerada a parede celular um importante fator de tolerância. Nestes fungos dematiáceos também foi observado um acúmulo de macromoléculas de melanina na camada mucilaginosa sobre a parte externa da parede celular. Estes dados indicam que este pigmento não serve apenas como protetor de raios UV, mas também protetor contra dissecação e lise celular (ZDANOVA e POKHODENKO, 1973; WHEELER e BELL, 1988). Corroborando esta hipótese, Kogej *et al.* (2006) também estudando a ultraestrutura de leveduras negras halofílicas, observaram que os grânulos de melanina na parte externa da parede celular eram frouxamente organizados quando crescidos em meios sem adição de sal (NaCl), mas tornaram-se mais densamente empacotados quando a concentração de sal no meio aumentou. Isto sugere que além da melanina ser o maior fator aditivo de virulência, uma vez que mutantes com deficiência neste pigmento são menos virulentos em *Exophiala* (DIXON *et al.*, 1992), estas macromoléculas apresentam um potencial osmoprotetor.

Além da melanina, outras substâncias extracelulares podem estar envolvidas na resistência a fatores estressantes. Ao observarem polissacarídeos extracelulares (EPS) cobrindo a parede de células leveduriformes apenas das linhagens de *Exophiala dermatitidis* isoladas de saunas, Matos *et al.* (2002) inferiram que este pode ser um fator essencial para sua sobrevivência neste ambiente. De acordo com outro estudo, o polissacarídeo também facilitaria a disseminação das células na água em função de sua natureza hidrofílica (HOOG, 1993).

Em uma revisão sobre ecologia e evolução de leveduras negras, Hoog *et al.* (2005) observaram uma similar distribuição da halotolerância e da habilidade para causar infecções nas principais ordens destes microrganismos. Portanto, os autores concluíram que um moderado grau de halotolerância pode ser considerado uma plesiomorfia que promoveria uma aptidão evolutiva, ou seja, as espécies com este carácter podem ser mais propensas à evolução em outras direções. Segundo Crespo *et al.* (2001) a sobrevivência das leveduras negras à fagocitose e subsequente morte por radicais de oxigênio do sistema imune inato, atividade

citotóxica do complemento, baixo pH, e privação de ferro pode ser promovida pela resposta dramática de uma complexa expressão gênica subjacente ao choque osmótico. Entretanto, fungos dematiáceos pronunciadamente halotolerantes são inflexíveis sob a perspectiva evolutiva (HOOG *et al.*, 2005).

McCallum *et al.* (2003) delegam a esta capacidade de sobrevivência dos patógenos a ação do estresse osmótico da água marinha por longos períodos, uma das explicações mais prováveis para sua relativamente rápida propagação nos oceanos. Neste estudo, foram utilizados dados empíricos para comparar a taxa de propagação de patógenos similares em sistemas marinhos e terrestres. Como resultado das análises, concluiu-se que a taxa de dispersão em ambientes marinhos é duas ordens de magnitude mais rápidas que em sistemas terrestres. Além da hipótese de maior resistência dos patógenos na água marinha, os autores tentam elucidar o fato com outras pressuposições. Em uma delas, relatam que a aproximada característica unidimensional (costeiras) de algumas epidemias marinhas pode significar que a taxa linear de propagação é maior que em epidemias terrestres, as quais são mais caracteristicamente bidimensionais. Em outra hipótese, expõem que ambientes marinhos podem não ter barreiras para dispersão de patógenos que caracterizam ambientes terrestres. Embora existam trabalhos significantes enfatizando barreiras ativas ao fluxo gênico no oceano, geradas por correntes de pequena escala e redemoinhos, muitos locais são efetivamente abertos e nada é conhecido sobre barreiras ao fluxo de patógenos. Desta maneira, mesmo nos locais onde o fluxo gênico é demonstrado restrito, é um grande pressuposto, e completamente não testado, que patógenos marinhos serão capturados pelas mesmas barreiras e processos que restringem o fluxo gênico de peixes e invertebrados. Por fim, McCallum *et al.* (2003) propõem ainda que as fortemente direcionadas correntes oceânicas que correm ao longo de muitas costas, podem ser responsáveis por propagação epidêmica.

No contexto da DCL, correntes como a do Norte do Brasil (NBC-North Brazil Current), um fluxo oceânico bem estabelecido de origem no Atlântico Sul que carrega água quente ao longo da costa nordeste do Brasil (através do equador e penetrando no hemisfério Norte) (SCHOTT *et al.*, 1998), podem tornar plausíveis propagações marinhas desta peculiar epizootia, tendo em vista o padrão de distribuição destes eventos e os resultados do presente estudo.

Schmidt (2006) estudando os efeitos de um dos eventos de DCL sob caranguejos *U. cordatus* no Sul da Bahia (Caravelas), também propôs uma dispersão marinha ao observar que os caranguejos localizados em zonas mais inundadas sofreram uma maior redução na densidade populacional. Logo, para uma completa compreensão epidemiológica da DCL, o isolamento direcionado a detecção de *Exophiala* sp. no oceano torna-se um passo imprescindível.

Nieves-Rivera (2005), realizando uma prospecção de fungos em manguezais de Porto Rico, detectou na espuma da água marinha, a presença da levedura negra *Exophiala werneckii*, filogeneticamente próxima ao agente etiológico da DCL.

Futuros estudos devem se aprofundar nos aspectos ecofisiológicos do agente etiológico desta enfermidade, uma vez que além destes fatores estarem ligados às elucidações epidemiológicas, podem explicar a natureza sazonal da epizootia, que apresenta uma maior frequência no verão.

REFERÊNCIAS

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p.161-167, 2005.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; VICENTE, V. A.; OSTRENSKY, A.; HUNGRIA, D.; CASTILHO, G. G. Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 73-81, 2007.

CARMICHAEL, J. W. Cerebral mycetoma of trout due to a *Phialophora*-like fungus. **Sabouraudia**, v. 5, p.120-123, 1966.

CRESPO, J. L.; DAICHO, T.; USHIMARU, T.; HALL, M. N. The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 34441-34444, 2001.

DIXON, D. M.; MIGLIOZZI, J.; COOPER, C. R.; SOLIS, O. JR.; BRESLIN, B.; SZANISZLO, P. J. Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathology studies. **Mycoses**, v. 35, p. 17-21, 1992.

GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; HOOG G. S. DE; PLEMENITAS, A. Hypersaline waters in salterns—natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, p. 235–240, 2000.

HOOG, G. S. DE. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105-109, 1993.

HOOG, G. S. DE; ZALAR, P.; GERRITS, A. H. G. VAN DEN ENDE; GUNDE-CIMERMAN, N. Relation of halotolerance to human-pathogenicity in the fungal Tree of Life: an overview of ecology and evolution under stress. In: **Adaptation to life at high salt concentrations in Archea, Bacteria, and Eukarya** (Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitas A, eds), p. 371–395, 2005.

HOOG, G. S. DE; ZALAR, P.; URZI, C.; LEO, F. DE; YURLOVA, N. A.; STERFLINGER, K. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 33–40, 1999.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v. 75, p.149–58, 1981.

KOGEJ, T.; GORBUSHINA, A. A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. **Mycological Research**, v. 110, n. 6, p. 713-724, 2006.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. River damming and changes in mangrove distribution. **ISME/GLOMIS Electronic Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2002.

LI, T.; PHILANDER, S. G. H. On the Annual Cycle of the Eastern Equatorial Pacific. **Journal of Climate**, v. 9, n. 12, p. 2986–2998, 1996.

MATOS, T.; HOOG, G. S. DE; BOER, A. G. DE; CROM, I. DE; HAASE, G. High prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* in steam baths. **Mycoses**, v. 45, p. 373–377, 2002.

MCCALLUM, H.; HARVELL, D.; DOBSON, A. Rates of spread of marine pathogens. **Ecology Letters**, v. 6, p. 1062–1067, 2003.

MCGINNIS, M. R.; AJELLO, L. A new species of *Exophiala* isolated from channel catfish. **Mycologia**, v. 66, p. 518-520, 1974.

NIENOW, J. A. ; FRIEDMANN, E. I. Terrestrial lithophytic (rock) communities. In: Friedmann E. I. (Ed.) **Antarctic Microbiology**, Wiley-Liss, New York, p. 343–412, 1993.

NIEVES-RIVERA, A. M. **Coastal mycology of Puerto Rico: A survey and biological aspects of marine, estuarine, and mangrove fungi**. Dissertation. University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 382 p., 2005.

PALMER, F. E.; EMERY, D. R.; STEMMLER, J.; STALEY, J. T. Survival and growth of microcolonial rock fungi as affected by temperature and humidity. **New Phytologist** v.107, p. 155–162, 1987.

PEDERSEN, O. A.; LANGVAD, F. *Exophiala psychrophila* sp. nov., a pathogenic species of the black yeasts isolated from farmed Atlantic salmon. **Mycology Research**, v. 92, p. 153-156, 1989.

PLEMENITAS, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea wueneckii* to high environmental salinity. In: Gunde-Cimerman, N.; Oren, A.; Plemenitas (eds). **Adaptation to life at high salt concentrations in Archea, Bacteria and Eukarya**. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 455–470, 2005.

SCHMIDT, A. J. **Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul Bahia**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Biológica, IOUSP, São Paulo, 199 p., 2006.

SCHOTT, F. A.; JUERGEN, F.; LOTHAR, S. Transports and pathways of the upper-layer circulation in the western tropical Atlantic. **Journal of Physical Oceanography**, v. 28, n. 10, p. 1904-1928, 1998.

STALEY, J. T.; PALMER F.; ADAMS J.B. Microcolonial Fungi: Common Inhabitants of Desert Rocks? **Science**, v. 215, p.1093–1095, 1981.

STERFLINGER, K.; HOOG, G. S. DE; HAASE, G. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 98–106, 1999.

STERFLINGER, K. Temperature and NaCl-tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 271–281, 1998.

UIJTHOF, J. M. J. **Taxonomy and phylogeny of the human pathogenic black yeast genus *Exophiala* Carmichael**. Tese. Universiteit van Amsterdam, 120 p., 1996.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Tese (doutorado em Agronomia, Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, 181 p., 2000.

WHEELER M. H.; BELL A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 2, p. 338–387, 1988.

WOLLENZIEN, U., HOOG G. S. DE, KRUMBEIN, W. E., URZÌ, C. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. **Science of the Total Environment**, v. 167, p. 287–294, 1995.

ZDANOVA, N. N.; POKHODENKO, V. D. The possible participation of a melanin pigment in the protection of a fungus cell from desiccation. **Microbiology** (English translation), v. 5, p. 753–757, 1973.

5 DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO: EFEITOS DA COCÇÃO SOBRE O AGENTE ETIOLÓGICO

RESUMO

Um dos pratos mais típicos nas áreas costeiras da região nordeste brasileira, é o caranguejo-uçá cozido. Após os freqüentes incidentes de mortandades de *Ucides cordatus* registrados em grande parte desta região, tornou-se de extrema importância, a avaliação da eficiência do procedimento de cocção na inativação desta levedura negra, eliminando-se riscos de contaminação cruzada após ingestão de animais moribundos. Portanto, o presente estudo teve por objetivo analisar a variação da temperatura interna dos caranguejos durante o cozimento, assim como, testar a resistência de *Exophiala* sp. a essa temperatura. Após ensaios *in vivo* e *in vitro*, foi estabelecido que a temperatura interna dos caranguejos iguala-se a de cocção, após aproximadamente 14 minutos. Além disso, curtos intervalos de exposição a essa elevada temperatura são suficientes para garantir a inativação das leveduras negras presentes em *U. cordatus* moribundos com DCL.

Palavras-chave: DCL. *Exophiala* sp. cocção.

5.1 INTRODUÇÃO

Toda semana, uma notável quantidade de caranguejos *Ucides cordatus* é consumida nas regiões costeiras do nordeste, dado o excelente tamanho destas espécies na fase adulta (OGAWA *et al.*, 1973). Aliada a esta característica, Fiscarelli (2004) observou nesta espécie um alto rendimento de carne quando comparado a outros braquiúros, além de uma taxa protéica de 16% e uma reduzida taxa de lipídeos (0,2%), que somados aos demais componentes mensurados por esta autora, caracteriza essa carne como uma excelente fonte nutritiva.

No município de Bragança (Pará), onde a atividade artesanal de captura de caranguejos-uçá alcança rendimentos anuais de 7 toneladas por km² de manguezais, é produzido retorno financeiro suficiente não só para as famílias dos catadores de caranguejo, mas também para movimentar o comércio local (ARAÚJO, 2006).

Após a captura, os caranguejos são transportados em caminhões sem qualquer controle higiênico, embalados em sacos de tecido ou simplesmente amarrados uns aos outros, ainda unidos aos resíduos de lama dos manguezais aos quais eles foram retirados. Quando os animais finalmente chegam às mãos dos intermediários, são deixados expostos em feiras para comercialização sem qualquer

tratamento higiênico, com exceção da lavagem realizada pelo próprio consumidor (VIEIRA *et al.*, 2004).

Por este motivo, é crescente o número de pesquisas direcionadas ao isolamento de patógenos relacionados à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos na carne de caranguejo-uçá. Theophilo (1992) isolou inúmeras cepas de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de *U. cordatus* comercializadas em restaurantes na Praia do Futuro (Fortaleza, Estado do Ceará); essa bactéria anaeróbica facultativa é reconhecida como um importante patógeno de humanos e animais de aquicultura (WONG *et al.*, 1999). Vieira *et al.* (2004), além de um elevado número de espécies *Vibrio* potencialmente prejudiciais a humanos, também detectou em amostras de carne de caranguejo-uçá, sorovares *Salmonella senftenberg* e *Salmonella poona*, microrganismos que habitam o trato intestinal dos humanos, o que indica uma situação preocupante de provável contaminação por esgoto nos locais de coletas dos animais. Esta hipótese é corroborada pelo isolamento, nessas mesmas amostras de caranguejos, de outros representativos gêneros das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae que também apresentam origem fecal.

Entretanto, conforme a Resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) – RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, que se aplica aos alimentos destinados ao consumo humano, é exigida a análise em pescados e produtos de pesca de apenas um restrito grupo de bactérias (*Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes - a 45°C), não sendo definidos valores de referência para demais microrganismos. Dentre esses microrganismos não obrigatoriamente avaliados, inclui-se a levedura negra *Exophiala* sp., agente etiológico da Doença do Caranguejo Letárgico, enfermidade responsável por diversos eventos de mortandades de *U. cordatus* desde 1997, afetando periodicamente diversos manguezais da região nordeste.

Estudos realizados com espécies de fungos dematiáceos filogeneticamente próximas ao agente causador da DCL, como *Exophiala dermatitidis* e *E. spinifera*, hipotetizam a ingestão como uma possível rota de infecções sistêmicas destes microrganismos em seres humanos (HIRUMA *et al.*, 1993; HOOG *et al.*, 1999).

Considerando-se que tradicionalmente o caranguejo-uçá é consumido após cocção em água e sal por aproximadamente 25 minutos, em função da característica textura adquirida pela carne (PEDROSA e COZZOLINO *et al.*, 2001), torna-se de

extrema importância avaliar se após este processo, caranguejos enfermos oferecem riscos à saúde dos seus consumidores. Portanto, o objetivo do presente estudo é esclarecer esta importante questão de saúde pública através da exposição de espécimes de *U. cordatus* à temperatura de cocção, avaliando-se o tempo necessário para que esta atinja os tecidos mais internos, e posteriormente, analisar por meio de ensaios *in vitro* a resistência de *Exophiala* sp. a essas elevadas temperaturas de fervura por intervalos variados de tempo.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Coleta do material biológico

Os espécimes de *U. cordatus* utilizados foram coletados na Ilha das Peças (Baía de Antonina, estado do Paraná). Logo após a captura e transporte, os caranguejos foram submetidos aos procedimentos experimentais.

A linhagem de *Exophiala* sp. avaliada nos ensaios *in vitro* foi isolada e purificada do tecido de caranguejos moribundos (BOEGER *et al.*; 2005, 2007). Posteriormente, fragmentos miceliais desta linhagem estocada em Ágar Sabouraud Dextrosado (Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná) foram plaqueados em meio Mycosel e incubados por duas semanas (25°C). As células leveduriformes e elementos de hifas obtidos nestas culturas foram suspensos em solução salina (2,5%), resultando em uma solução estoque de aproximadamente 2×10^7 elementos fúngicos por mL (manipulações efetuadas em fluxo laminar - LabCon Co. Purifier Class II).

5.2.2 Avaliação da temperatura interna dos *U. cordatus* submetidos à cocção

Um total de 8 caranguejos foram introduzidos, individualmente, em um recipiente com água fervendo à temperatura de 98°C. Posteriormente, as temperaturas internas foram aferidas em intervalos de 15 segundos, com o auxílio de um termômetro digital para alimentos (Digital Thermo; Thermopress, France) (inserido na carapaça, abaixo da localização do coração) e um cronômetro (Traceable®).

5.2.3 Ensaios de resistência de *Exophiala* sp. a temperatura de cocção

Alíquotas de 50 µL da solução estoque foram inoculadas em 4 tubos PCR® (0,2mL). Posteriormente, cada microtubo foi exposto à temperatura de 98°C em um termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf) por diferentes intervalos de tempo, compondo assim, tratamentos com 0, 30, 120 e 300 segundos. Os conteúdos destes tubos foram individualmente plaqueados em meio Mycosel e incubados por 14 dias a 25°C. Em seguida, fotos digitais (Sony MVC-CD500) das 4 placas de Petri (90x15mm) resultantes foram analisadas com o auxílio de ferramentas do programa SigmaScan® Pro 5.0 (Systat Software Inc.). Todas imagens foram convertidas para escalas de cinza, standardizando-se a aferição apenas dos elementos com limiar de intensidade superior a 60 píxeis, ou seja, apenas as áreas ocupadas por colônias de *Exophiala* sp. Todo o experimento foi repetido 5 vezes.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Temperatura interna de *Ucides cordatus*

Com exceção de um único caranguejo-uçá que só alcançou sua máxima temperatura interna após aproximadamente 20 minutos de cocção (espécime 06), os demais *U. cordatus* (87,5%) necessitaram no máximo de 14 minutos para atingi-la (em torno de 98°C) (FIGURA 25).

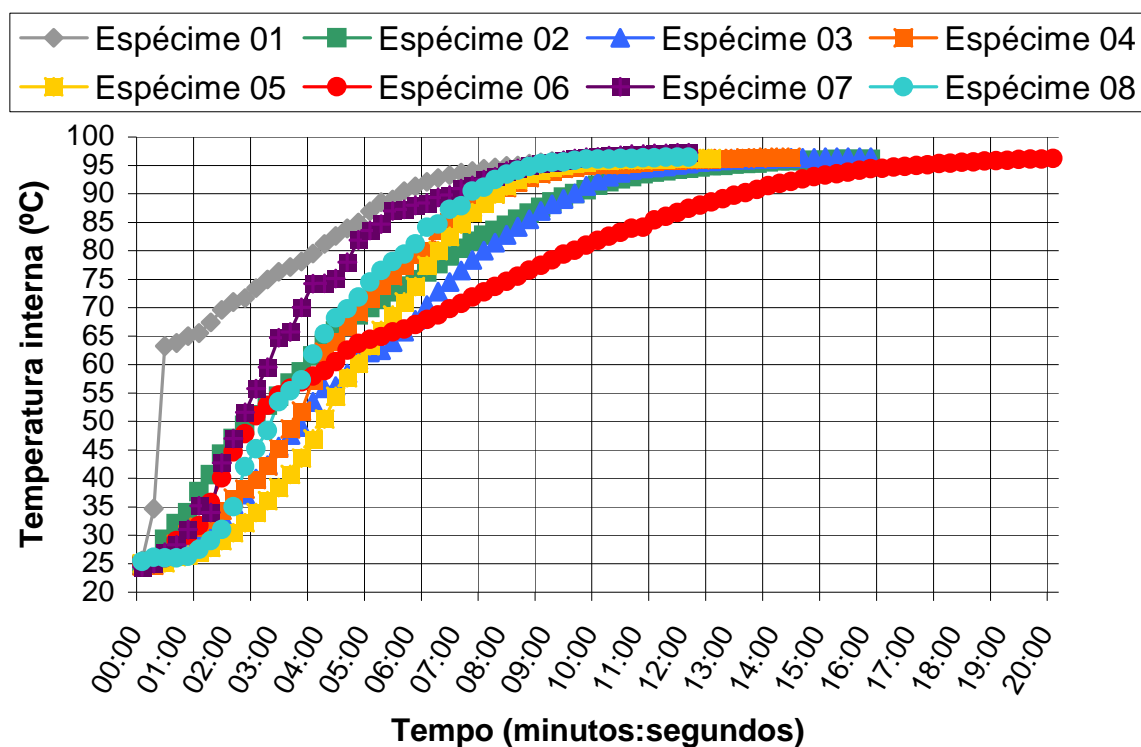


FIGURA 28- ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA INTERNA DE ESPÉCIMES DE *Ucides cordatus* SUBMETIDOS À COCÇÃO
 FONTE: O autor (2008)

5.3.2 Resistência de *Exophiala* sp. a temperatura de cocção

O crescimento de colônias não foi observado em nenhum dos tratamentos, com exceção do grupo controle (0 segundos), cujas colônias leveduriformes ocuparam uma média de 1.548,7 mm² das placas (FIGURA 29).

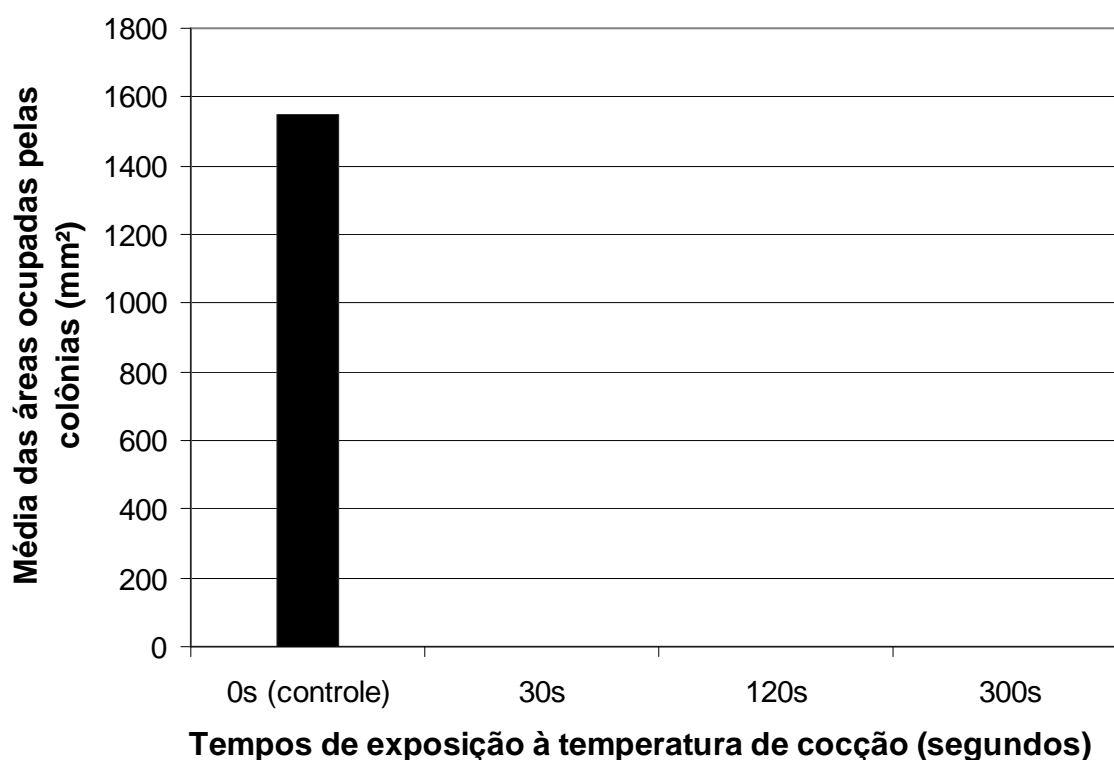


FIGURA 29- CRESCIMENTO LEVEDURIFORME DE *Exophiala* sp. APÓS CRESCENTES INTERVALOS DE EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA DE COCÇÃO

5.4 DISCUSSÃO

O presente estudo elucidou uma importante questão de saúde pública gerada pelos eventos de mortandade da DCL, uma vez que, baseado em ensaios *in vivo* e *in vitro*, demonstrou a eficiência das altas temperaturas de cocção na eliminação do agente etiológico desta enfermidade.

Sterflinger (1998), avaliando a temperatura letal de leveduras negras habitantes de rochas, observou que a desidratação é um importante pré-requisito para esse microrganismo suportar altas temperaturas. Em seu estudo, o micélio desidratado de uma linhagem de *Exophiala* suportou a elevada temperatura de 120°C por pelo menos 0,5 hora, obtendo atividade de crescimento completo após transferência para meio fresco. Entretanto, os micélios hidratados desta mesma linhagem só suportaram 70°C.

Portanto, a umidade presente no tradicional modo de preparo dos caranguejos *U. cordatus*, em grandes quantidades de água em ebulição, mostra-se efetiva na eliminação de *Exophiala* sp. Além disso, em uma avaliação nutricional de mariscos crus e cozidos, Pedrosa e Cozzolino (2001) relataram que o processo de

cocção potencializa o valor nutritivo da carne de caranguejos-uçá, aumentando a fração protéica, diminuindo a taxa de lipídeos e mantendo os conteúdos minerais (de zinco, cobre e ferro).

Entretanto, estudos direcionados a avaliação da patogenicidade do agente causador da DCL a hospedeiros mamíferos, através de inoculações intraperitoniais em camundongos, por exemplo, serão de extrema importância para compreensão dos efeitos de uma possível infecção cruzada destes microrganismos, que podem afetar os catadores de caranguejo e outras pessoas que os manipulam e transportam. Além disso, modelos experimentais de intubação oral poderão explicar o potencial infectivo de *Exophiala* sp. após ingestão, uma vez que contaminações por *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. já foram detectadas na carne de caranguejos-uçá previamente cozidos (VIEIRA *et al.*, 2004).

Apesar da característica ubiquidade das leveduras negras, são poucos os relatos de contaminação de alimentos por estes microrganismos. Kazanas (1986) isolou uma linhagem de *Exophiala dermatitidis*, conhecido agente causador de infecções em humanos, de cogumelos dessecados. Posteriormente, por meio de inoculações intraperitoniais e intragástrica em camundongos, o autor comprovou o potencial de infectividade sistêmica das leveduras por ambas as vias.

Essa comprovada nocividade das leveduras negras evidencia a necessidade de estudos adicionais direcionados a avaliação do poder infectivo de *Exophiala* sp. em humanos. Contudo, no momento, as agências de vigilância sanitária devem alertar a população a respeito dos corretos procedimentos a serem adotados na cocção de *U. cordatus*, a fim de se evitar contaminações cruzadas, principalmente, nos locais que apresentaram eventos de mortandade no passado.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.R. **Fishery statistics and commercialisation of the mangrove crab, *Ucides cordatus* (L.), in Bragança – Pará – Brazil, Unpublished PhD thesis, University of Bremen, 176 p., 2006.**
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 161-167, 2005.
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; VICENTE, V. A.; OSTRENSKY, A.; HUNGRIA, D.; CASTILHO, G. G. Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 73-81, 2007.
- FISCARELLI, A.G. **Rendimento, análise químicabromatológica da carne e fator de condição do caranguejo-Uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae).** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 92 p. 2004.
- HIRUMA, M.; KAWADA, A.; OHATA, H.; OHNISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; YAMAZAKI, M.; ISHIBASHI, A.; HATSUSE, K.; KAKIHARA, M.; YOSHIDA, M. Systemic phaeohyphomycosis caused by *Exophiala dermatitidis*. **Mycoses**, v. 36, p. 1–7, 1993.
- HOOG, G. S. DE, POONWAN, N., GERRITS, A. H. G. VAN DEN ENDE. Taxonomy of *Exophiala spinifera* and its relationship to *E. jeanselmei*. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 133–42, 1999
- KAZANAS, N. Pathogenicity of a fungus resembling *Wangiella dermatitidis* isolated from edible mushrooms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.261-267, 1986.
- OGAWA, M.; ALVES, T.T.; CALAND-NORONHA, M.C.; ARARIPE, C.A.E. & MAIA, E.L., Industrialização do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus). 1 - Técnicas para o processamento da carne. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v.13, n. 1 p. 31-37, 1973.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 154-157. 2001.

STERFLINGER, K. Temperature and NaCl-tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 271–281, 1998.

THEOPHILO, G. N. D. **Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em caranguejos comercializados em Fortaleza, CE**. Ceará, 1992.122p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará. Resumo.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E. F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crab *Ucides cordatus*. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 4, p. 179-182, 2004.

WONG, H.C.; CHEN, M.C.; LIU, S.H; LIU, D.P. Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p.181–188, 1999.